

DÉBORA JOANA FACHIN SCHEIT

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO ANIMAL PARA
DEPENDÊNCIA DE ETANOL EM CAMUNDONGOS: VALIDAÇÃO
PREDITIVA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Roseli Boerngen de Lacerda

CURITIBA

2004

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marlene e Paulino, a meu irmão, Paulo Roberto, meu esposo, Ederson, pelas horas de paciência e apoio e por compartilhar as conquistas.

Aos professores, técnicos, colegas, e amigos do Curso de Mestrado em Farmacologia.

Ao Laboratório Cristália, pela doação da naltrexona.

À professora Roseli, por ter incentivado o meu crescimento científico e sobretudo humano, por ter me apoiado em todos os momentos, por ser uma grande amiga.

E A DEUS SEJA A GLÓRIA!

À sabedoria

“O temor do Senhor é o princípio da sabedoria.”

*“O vinho é escarnecedor, e a bebida forte, alvoroçadora; todo aquele que por eles é
vencido não é sábio.”*

Provérbios 1:7 e 20:1

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vi
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 MODELOS ANIMAIS EM PSICOFARMACOLOGIA	01
1.2 MODELOS ANIMAIS DE DEPENDÊNCIAS DE DROGAS	03
1.2.1 Modelos que estudam as propriedades reforçadoras positivas	04
1.2.2 Modelos que estudam as propriedades reforçadoras negativas	05
1.2.3 Modelos de dependência: procura à droga, uso compulsivo e recaída	07
1.4 VALIDAÇÃO DE MODELOS ANIMAIS	10
1.5 DROGAS ANTI-CRAVING: ACAMPROSATO E NALTREXONA	11
2 HIPÓTESE	15
3 OBJETIVOS	16
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 ANIMAIS	17
4.2 DROGAS	17
4.3 MATERIAL E EQUIPAMENTOS	18
4.3.1 Equipamentos e Procedimentos	18
4.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	20
4.4.1 Experimento 1: Modelo de dependência por livre escolha	20
4.4.2 Experimento 2: Avaliação Comportamental	20
4.4.2.1 Avaliação Comportamental Basal	20
4.4.2.2 Avaliação Comportamental na Abstinência	20
4.4.3 Experimento 3: Validação farmacológica do modelo de dependência: tratamento com naltrexona	21
4.5 CÁLCULO DA QUANTIDADE DE ETANOL INGERIDO	23
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	23
5 RESULTADOS	25
5.1 EXPERIMENTO 1: MODELO DE DEPENDÊNCIA POR LIVRE ESCOLHA	25
5.1.1 Padrão Geral de Consumo	25
5.1.2 Padrão Individual de Consumo	27

5.1.3 Padrão de Consumo nos Grupos.....	52
5.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL	64
5.2.1 Avaliação comportamental basal.....	64
5.2.2 Avaliação comportamental na abstinência.....	64
5.3 EXPERIMENTO 3: VALIDAÇÃO FARMACOLÓGICA DO MODELO DE DEPENDÊNCIA: TRATAMENTO COM NALTREXONA.....	68
5.3.1 Consumo de etanol (g/kg) durante 24h após a administração de naltrexona.....	68
5.3.1 Consumo de etanol (g/kg) durante 90 min após a administração de naltrexona.....	70
5.3.3 Consumo de água (mL) durante 24h após a administração de naltrexona.....	71
5.3.3 Consumo de água (mL) durante 90 min após a administração de naltrexona.....	73
6 DISCUSSÃO	75
7 CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS	89
APÊNDICE 1 – AVERSIVIDADE AO SABOR DE QUININA.....	102
APÊNDICE 2 – ANIMAIS COM PERFIL DE CONSUMO INDEFINIDO.....	104
APÊNDICE 3 – ANÁLISES COMPORTAMENTAIS	109
APÊNDICE 4 – PESOS POR GRUPO.....	117

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – CORRELAÇÕES ENTRE OS CONSUMOS NAS DIFERENTES FASES DO MODELO	26
FIGURA 2 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 2, 10 E 13 DO GRUPO D	30
FIGURA 3 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 16, 18 E 20 DO GRUPO D	31
FIGURA 4 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 24, 25 E 26 DO GRUPO D	32
FIGURA 5 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 29, 30 E 33 DO GRUPO D	33
FIGURA 6 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 34, 36 E 53 DO GRUPO D	34
FIGURA 7 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 11, 17 E 22 DO GRUPO P	37
FIGURA 8 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 28, 31 E 32 DO GRUPO P	38
FIGURA 9 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 35, 37 E 39 DO GRUPO P	39
FIGURA 10 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 48, 49 E 50 DO GRUPO P	40
FIGURA 11 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 56 E 59 DO GRUPO P	41
FIGURA 12 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 4, 5 E 14 DO GRUPO L	44
FIGURA 13 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 19, 21 E 27 DO GRUPO L	45
FIGURA 14 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 40, 41 E 44 DO GRUPO L	46
FIGURA 15 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 45, 46 E 47 DO GRUPO L	47

FIGURA 16 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 51, 55 E 57 DO GRUPO L	48
FIGURA 17 – CONSUMO PARA O ANIMAL 58 DO GRUPO L	49
FIGURA 18 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 61, 62, 63 E 64 DO GRUPO CONTROLE	50
FIGURA 19 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 65, 66, 67, 68, 69 E 70 DO GRUPO CONTROLE	51
FIGURA 20 – CONSUMO DE ETANOL g/kg POR GRUPO	53
FIGURA 21 – CONSUMO DE ETANOL TOTAL (mL) POR GRUPO	55
FIGURA 22 – CONSUMO DE ETANOL 5% POR GRUPO	56
FIGURA 23 – CONSUMO DE ETANOL 10% POR GRUPO	58
FIGURA 24 – CONSUMO DE ÁGUA POR GRUPO	59
FIGURA 25 – PREFERÊNCIA ENTRE ÁGUA E ETANOL POR GRUPO	60
FIGURA 26 – PREFERÊNCIA ENTRE ÁGUA E ETANOL POR GRUPO E POR FASE	61
FIGURA 27 – CONSUMO DE ETANOL E ÁGUA	63
FIGURA 28 – AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL BASAL (B) E NA FASE DE ABSTINÊNCIA (A).....	66
FIGURA 29 – AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL BASAL (B) E NA FASE DE ABSTINÊNCIA (A).....	67
FIGURA 30 – CONSUMO DE ETANOL (g/kg) EM 24h	69
FIGURA 31 – CONSUMO DE ETANOL (g/kg) EM 90 min.....	71
FIGURA 32 – CONSUMO DE ÁGUA (mL) EM 24h	72
FIGURA 33 – CONSUMO DE ÁGUA (mL) EM 90 min.	74
 TABELA 1 – PADRÃO INDIVIDUAL DE CONSUMO DE ETANOL DO GRUPO DEPENDENTE E PREFERÊNCIA ENTRE ETANOL E ÁGUA PARA CADA FASE EXPERIMENTAL.....	29
TABELA 2 – PADRÃO INDIVIDUAL DE CONSUMO DE ETANOL DO GRUPO PESADO E PREFERÊNCIA ENTRE ETANOL E ÁGUA PARA CADA FASE EXPERIMENTAL.....	36

TABELA 3 – PADRÃO INDIVIDUAL DE CONSUMO DE ETANOL DO GRUPO LEVE E PREFERÊNCIA ENTRE ETANOL E ÁGUA PARA CADA FASE EXPERIMENTAL.....	43
--	----

ILUSTRAÇÕES APÊNDICE

APÊNDICE 1

TABELA 1 – CONSUMO DE LÍQUIDO DE ACORDO COM A CONCENTRAÇÃO DE QUININA.....	103
---	-----

APÊNDICE 2

FIGURA 1 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 1, 6 E 7 COM PERFIL DE CONSUMO INDEFINIDO.....	105
FIGURA 2 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 8, 9 E 12 COM PERFIL DE CONSUMO INDEFINIDO.....	106
FIGURA 3 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 15, 23 E 38 COM PERFIL DE CONSUMO INDEFINIDO.....	107
FIGURA 4 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 42, 52 E 54 COM PERFIL DE CONSUMO INDEFINIDO.....	108
TABELA 1 – PADRÃO INDIVIDUAL DE CONSUMO DE ETANOL DOS ANIMAIS COM PERFIL DE CONSUMO INDEFINIDO E PREFERÊNCIA ENTRE ETANOL E ÁGUA PARA CADA FASE EXPERIMENTAL.....	104

APÊNDICE 3

TABELA 1 – COMPARAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS COMPORTAMENTAIS PARAMÉTRICAS MEDIDAS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	110
TABELA 2 – COMPARAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS COMPORTAMENTAIS NÃO PARAMÉTRICAS MEDIDAS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	112

TABELA 3 – COMPARAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS COMPORTAMENTAIS PARAMÉTRICAS MEDIDAS NO CAMPO ABERTO	113
TABELA 4 – COMPARAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS COMPORTAMENTAIS NÃO PARAMÉTRICAS MEDIDAS NO CAMPO ABERTO	114
TABELA 5 – COMPARAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS COMPORTAMENTAIS PARAMÉTRICAS MEDIDAS NA CAIXA DE MOVIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA	115
TABELA 6 – COMPARAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS COMPORTAMENTAIS NÃO PARAMÉTRICAS MEDIDAS NA CAIXA DE MOVIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA	116
APÊNDICE 4	
FIGURA 1 – PESO POR GRUPO.....	117

RESUMO

O objetivo principal deste estudo foi dar continuidade ao desenvolvimento de um modelo animal de dependência ao etanol por livre escolha em camundongos, realizando a sua validação farmacológica. Um grupo de camundongos (n=60) foi exposto ao modelo de livre escolha entre soluções etílicas (5% e 10%) e água, que consistiu em um procedimento dividido em quatro fases: livre escolha (LE - 10 semanas), abstinência (AB - 2 semanas), reapresentação (RE - 2 semanas) e adulteração (AD - 2 semanas), enquanto que outro grupo tinha acesso apenas à água (grupo controle, n=10) no mesmo período. Os animais foram alojados individualmente com ração à vontade. Durante todo o experimento, os consumos de água e etanol foram avaliados diariamente. Com base no consumo individual de etanol (g/kg) em cada uma das fases, os camundongos foram classificados em 3 grupos: “dependentes” (**D**, n= 15), que apresentaram alto consumo e preferência pelo etanol sem reduzir o consumo na fase de adulteração; “pesados” (**P**, n= 14) alto consumo e preferência pelo etanol com redução na fase de adulteração, e “leves” (**L**, n= 16) que apresentaram preferência pela água e baixo consumo de etanol durante todas as fases. Seu comportamento foi avaliado nos aparelhos labirinto em cruz elevado, campo aberto e caixa de movimentação espontânea, antes do início do procedimento de livre escolha e 5 horas após a suspensão do etanol durante o período de abstinência. Os grupos dependente e pesado apresentaram comportamento sugestivo de ansiedade 5 horas após a suspensão da administração do etanol, ou seja, diminuíram a ambulação no campo aberto e aumentaram o tempo de permanência no centro do labirinto, sugerindo a presença de síndrome de abstinência. Após a exposição ao modelo de livre escolha, os animais **D**, **P** e **L** foram distribuídos para o tratamento com naltrexona (0,0 – 0,125 – 2,0 e 16,0 mg/kg i.p.) ou com salina. Cada animal dos grupos designados para tratamento com naltrexona recebeu todas as doses que foram administradas na seguinte ordem: 2,0 – 0,125 – 16,0 mg/kg e a dose de naltrexona 0,0 mg/kg (injeção de salina) foi administrada entre as outras doses utilizando o método de distribuição por quadrado latino. Cada dose foi administrada por 2 dias consecutivos e entre as doses foi dado um intervalo de 4 dias. Os camundongos tiveram livre escolha entre água e etanol 30 minutos após a administração da naltrexona e tiveram acesso somente à água durante o intervalo de 4 dias entre as doses. Os animais dos grupos **D**, **P** e **L** designados para receber salina foram submetidos às mesmas condições e ao mesmo esquema experimental do grupo tratado com naltrexona. Os 10 animais do grupo controle receberam as doses de naltrexona e foram divididos em 2 grupos: metade continuou com acesso somente à água (Controle+H₂O) e metade passou a ter acesso à água e às soluções de álcool (Controle+LE). Os consumos de etanol e de água foram quantificados durante um período de 90 min e de 24 h a partir do acesso às soluções. A naltrexona reduziu significativamente o consumo de etanol na avaliação durante 90 minutos para o grupo pesado e uma redução não significativa para o grupo dependente. O consumo de água não foi afetado significativamente. Estes resultados sugerem que a naltrexona reduziu o consumo de etanol porém apenas nos animais com consumo controlado. Isso sugere uma ação da naltrexona sobre o reforço positivo do etanol e que influenciaria mais os bebedores controlados, os quais estariam consumindo etanol pelas suas propriedades reforçadoras positivas. Os animais dependentes que perderam o controle sobre a ingestão do

álcool não seriam responsivos à naltrexona questionando-se a sua sugerida ação anti-*craving*. São discutidas as validades de face e preditiva deste procedimento propondo como um modelo “naturalista” de dependência para camundongos que permite caracterizar diferentes níveis de consumo de etanol numa maneira análoga ao que se observa em humanos.

ABSTRACT

To further the understanding of the neurobiology of alcohol addiction, the present study was undertaken with the aim of validating pharmacologically a mouse model of alcohol addiction. A group of mice (n=60) was offered ethanol solutions (5% and 10%) and water in a free choice paradigm consisting of four phases: free choice (FC - 10 weeks), withdrawal (W - 2 weeks), re-exposure (RE - 2 weeks) and adulteration (AD - 2 weeks). A control group of mice (n=10) only had access to water. The animals were housed individually with food *ad libitum*. During all the experiment, ethanol and water intake were measured daily. Based on the individual ethanol intake (g/kg), the mice were characterized into 3 groups: dependent (**D**, n=15), being those which presented high ethanol intake and preference for ethanol without reducing their intake when ethanol solutions were adulterated with quinine; heavy drinker (**H**, n=14), being those which showed high ethanol intake and preference for ethanol but reduced their intake when ethanol solutions were adulterated with quinine; and light drinker (**L**, n=16), being those which presented low ethanol intake and preference for water. The animals' behavior was evaluated in the activity cages, open field and elevated plus maze before the self-administration treatment and during the withdrawal period 5 hours after the ethanol withdrawal. **D** and **H** groups exhibited anxiety in the withdrawal period evaluation manifested through the ambulation reduction in the open field and the increased time spent in the center of the plus maze. These observations suggest withdrawal syndrome manifestation. After the exposure to the free-choice model, **D**, **H** and **L** groups were distributed to naltrexone (0.0; 0.125; 2.0 and 16.0 mg/kg) or saline i.p. treatment. Each animal received all doses of naltrexone in the following sequence: 2.0 – 0.125 – 16.0 mg/kg and the 0.0 mg/kg (saline injection) was administered between two doses of naltrexone according to Latin square distribution procedure. Each naltrexone dose was administered in two consecutive days and then, a four-day interval was given. Mice had free choice among water and ethanol solutions 30 minutes after the naltrexone administration and had access to water during the four-day interval between naltrexone doses. **D**, **H** and **L** mice designated to receive saline treatment were submitted to the same procedure. The control group (n=10) received the same naltrexone treatment schedule: five mice had access to water (Control+H₂O) and the other five ones had free choice among water and ethanol solutions (Control+FC). Ethanol and water intake were measured during 90 minutes and 24 hours after the liquid access. Naltrexone reduced ethanol intake significantly in the **H** group and non-significantly in the **D** group with no effect on water intake. These data suggest that naltrexone reduced ethanol consumption only in the controlled drinkers suggesting its role over the positive reinforcing properties of ethanol. Naltrexone had no effect in the dependent mice which had lost their control over ethanol consumption suggesting its inefficacy as anti-craving drug. It is discussed the face and predictive validities of this procedure as a “natural” mouse model of addiction that allows different levels of alcohol consumption to be characterized in a manner analogous to that observed in humans.

1 INTRODUÇÃO

A humanidade, desde o início de sua existência, sempre procurou, em seu meio ambiente, substâncias que alterassem suas percepções. Atualmente o uso de drogas psicoativas em países ocidentais é bastante comum e atinge proporções alarmantes e crescentes. Entre as substâncias mais utilizadas pela população adulta estão o álcool e a cafeína. Somente em relação ao álcool, sabe-se que o quadro de alcoolismo é o quarto problema médico que leva à incapacitação do paciente. Em adultos, a morte por cirrose causada por consumo excessivo de álcool ocupa a sétima colocação entre as causas de morte. No Brasil, num estudo epidemiológico realizado em 2001 pelo CEBRID (Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas), entre os 8.589 entrevistados, escolhidos aleatoriamente e representativos das 107 cidades do Brasil com mais de 200 mil habitantes, observou-se que o uso de álcool na vida, nas diferentes regiões, variou de 53% na região norte a 71,5% na região sudeste. Esse mesmo estudo mostrou que a taxa de dependentes de álcool variou de 9,2% na região sudeste a 16,9 % na região nordeste (CARLINI, 2002). Os problemas decorrentes do uso abusivo de álcool comprometem profundamente as funções biológica, psicológica e social dos indivíduos afetados. Compreender melhor os mecanismos neurobiológicos envolvidos nessas alterações e desenvolver tratamentos eficazes para o alcoolismo se faz necessário para que esse problema possa começar a ser resolvido. Para isso, a pesquisa pré-clínica tem sido de grande valia no avanço do conhecimento nesta área da ciência.

1.1 MODELOS ANIMAIS EM PSICOFARMACOLOGIA

A pesquisa pré-clínica tem sido empregada na avaliação de novos fármacos, no delineamento dos seus mecanismos de ação e no estudo da neurobiologia e genética dos transtornos mentais. Os modelos animais contribuem significativamente para o desenvolvimento das neurociências como um todo, embora devemos reconhecer algumas importantes limitações, particularmente em relação ao aspecto subjetivo e introspectivo dos transtornos mentais inacessíveis à pesquisa pré-clínica, uma vez que os modelos fundamentam-se na observação do comportamento dos animais (GUIMARÃES, 1993; ANDREATINI, 2002). É difícil estabelecer modelos

animais apropriados porque não há provas conclusivas se o que ocorre no cérebro de animais é comparável ao que ocorre no cérebro humano (YAMAMOTO; UNE, 2002). Apesar disto, os transtornos mentais que possuem modelos válidos são aqueles que apresentam maior conhecimento (ou hipóteses) sobre sua neurobiologia. De qualquer maneira, os modelos animais permitem o estudo da contribuição de um determinado fator para o transtorno mental com controle de outros, ou mesmo estudar a interação entre múltiplos fatores.

Na interpretação dos resultados experimentais e na sua extrapolação para a clínica deve-se considerar que não existem modelos animais ideais dos transtornos mentais (GUIMARÃES, 1993). Na escolha do modelo a ser empregado deve-se levar em consideração o objetivo da utilização do modelo, pois é a partir deste objetivo que será considerada a sua aplicabilidade para determinado experimento (GEYER; MARKOU, 1995). Algumas questões práticas, particularmente em estudos iniciais com novos fármacos, devem ser consideradas na escolha de um modelo: a rapidez e simplicidade na execução, fidedignidade dos resultados e baixo custo.

Animais são usados na pesquisa sobre dependência de drogas pelas mesmas razões que são utilizados em qualquer pesquisa médica: entender as causas da doença e desenvolver novos tratamentos. Os modelos animais permitem aos pesquisadores usar métodos que seriam contra a ética em humanos, pois as drogas de abuso apresentam risco de desenvolver dependência além de poder causar acidentes, problemas médicos e psicológicos no sujeito experimental. Também existem razões conceituais para usar modelos animais: embora células e tecidos possam ser usados para estudos bioquímicos e de biologia molecular, não existe maneira de relacionar os resultados desses estudos com comportamentos particulares.

No entanto, nenhum modelo animal reproduz totalmente todas as características da doença humana. Em geral, selecionam-se certos sintomas característicos do transtorno nos humanos e desenvolvem-se condições semelhantes nos animais de laboratório (CUNNINGHAM et al., 2000; KOOB, 2000; SPANAGEL, 2000).

1.2 MODELOS ANIMAIS DE DEPENDÊNCIAS DE DROGAS

Nos modelos animais para drogas de abuso, dois objetivos principais são almejados. O primeiro deles visa estudar as conseqüências do uso crônico das drogas, incluindo o desenvolvimento de tolerância/sensibilização e da dependência física/síndrome de abstinência. Nesses modelos, a droga é administrada pelo pesquisador de maneira forçada através da dieta, ou de intubação gástrica, ou por injeção e até mesmo por inalação. O segundo objetivo visa estudar no animal o comportamento de procura à droga. Os modelos de comportamento de procura à droga tentam demonstrar as propriedades reforçadoras das drogas, as quais se acredita desempenhem um papel central no desenvolvimento da dependência (SPANAGEL, 2000; MEISCH, 2001).

As ações farmacológicas primárias das drogas produzem reforço positivo e/ou negativo. O reforço positivo refere-se a um evento prazeroso que aumenta a probabilidade de resposta de procura à droga. As drogas de abuso são consideradas reforçadores positivos pela sua capacidade de induzir sensações de prazer ou de elevação do humor. O reforço negativo refere-se à propriedade de evitar um evento aversivo. Exemplos de reforçamento negativo pelas drogas de abuso incluem situações nas quais o indivíduo se automedica com a droga na tentativa de aliviar um estado aversivo (depressão ou ansiedade) ou de tratar um estado aversivo gerado pela droga (síndrome de abstinência). Os dois tipos de reforço poderiam ser responsáveis pelo comportamento de procura à droga, pelo desenvolvimento de dependência e pelo retorno ou recaída ao uso após períodos de abstinência (USDHHS, 2000).

Um outro tipo de reforçamento não relacionado às propriedades farmacológicas das drogas, mas que também possui propriedades motivacionais importantes, é conhecido como reforço condicionado. Esse reforço refere-se à capacidade dos indivíduos aprenderem a associar os efeitos reforçadores positivos e negativos das drogas com um evento ou estímulo inicialmente neutro. Por exemplo, uma pessoa entrar num bar habitualmente freqüentado por ele pode causar sentimentos/sensações positivos semelhantes aos induzidos pelo álcool. A associação de estímulos pode ocorrer também com situações aversivas como, por exemplo, associar um determinado ambiente com os aspectos desagradáveis da síndrome de abstinência (USDHHS, 2000).

Os modelos animais desenvolvidos até o momento para estudar dependência de drogas podem ser classificados em três grupos: modelos que estudam as propriedades reforçadoras positivas, modelos que estudam as propriedades reforçadoras negativas e modelos que tentam mimetizar aspectos diferentes da adição, como o uso compulsivo (*craving*), a recaída e a perda do controle sobre o uso (SHIPPENBERG; KOOB, 2002; SPANAGEL, 2000).

1.2.1 Modelos que estudam as propriedades reforçadoras positivas

As drogas de abuso funcionam como estímulos reforçadores positivos, sendo essa sua propriedade a base conceitual para a auto-administração das drogas. Duas abordagens para o estudo da auto-administração das drogas são a preferência oral e o comportamento operante. Na primeira abordagem, os animais têm, em suas gaiolas-casas, livre acesso à droga e escolhem livremente entre água e uma ou várias soluções contendo diferentes concentrações de droga. Normalmente os animais devem escolher entre duas garrafas, uma contendo a droga e a outra contendo uma solução sem a droga, que pode ser doce ou não. A proporção de droga ingerida em relação ao consumo total de líquidos é usada para caracterizar a preferência do animal (CUNNINGHAM et al., 2000). Esse modelo de preferência é mais utilizado para o estudo do álcool, inclusive tendo sido usado como base para seleção genética entre animais que preferem (P - preferring, sP – Sardinian preferring) e os que não preferem álcool (NP – non-preferring, sNP – Sardinian non-preferring) o álcool (LI, 2000), mas também existem estudos usando cocaína (JENTSCH, 1998). A limitação desse tipo de modelo é que não se pode dizer que o fato do animal preferir a droga signifique que ele esteja dependente. Apenas é possível interpretar que o animal procura a droga quer seja por suas propriedades reforçadoras positivas, quer pelas negativas (por exemplo, esses animais selecionados geneticamente como P, são animais mais ansiosos e apresentam menores níveis de serotonina no SNC) (USDHHS, 2000).

Na abordagem que utiliza o condicionamento operante (auto-administração operante), a preferência entre água e droga também pode ser medida após treinar os animais para obter água ou droga pressionando uma de duas alavancas (uma para cada líquido) existentes na gaiola ou aprender a percorrer um túnel para obter a droga. A droga pode ser obtida por via oral, por intubação gástrica, por injeção

intravenosa ou por injeção intracraniana, dependendo das características da droga e do esquema de condicionamento operante. Por exemplo, o álcool não pode ser administrado por via endovenosa ou intracraniana por ser difícil o controle seguro da sua dose. A quantidade da droga que o animal consome está relacionada à quantidade de trabalho que ele realiza. Esses estudos permitem avaliar não somente a preferência pela droga, mas também a motivação do animal para trabalhar para obter a droga em diferentes condições e demonstram as propriedades reforçadoras positivas das drogas (KOOB, 2000).

Outro modelo usado para estudar as propriedades reforçadoras positivas das drogas envolve tarefa de preferência condicionada de lugar. Esse modelo é um procedimento de condicionamento clássico no qual a administração de uma droga por injeção é pareada com um ambiente determinado e a administração de placebo é pareada com um ambiente distinto. Após vários pareamentos, expõem-se os animais, sem ter recebido injeção, permitindo seu livre acesso aos ambientes e medindo o tempo gasto em cada ambiente e em cada acesso. Quando o animal escolhe passar a maior parte do tempo no ambiente pareado com a droga interpreta-se como uma medida direta do efeito reforçador positivo da droga. Drogas com propriedades aversivas apresentarão efeito contrário, ou seja, os animais permanecerão menos tempo no ambiente pareado com a droga. Drogas que produzem preferência condicionada para ambientes associados à droga são aquelas que funcionam como reforçadores positivos em outros paradigmas (SHIPPENBERG; KOOB, 2002).

1.2.2 Modelos que estudam as propriedades reforçadoras negativas

A retirada de uma droga após uso crônico prolongado, normalmente é caracterizada por respostas opostas às ações agudas iniciais da droga, sendo denominada de síndrome de abstinência. Quando esta se manifesta considera-se que o indivíduo está dependente físico. Os sintomas presentes naquela síndrome são na maioria aversivos ao indivíduo que os experimentam. Postula-se que o retorno ao uso da droga após a experiência da síndrome de abstinência ou para evitá-la representaria uma das propriedades reforçadoras negativas das drogas. Vários modelos animais têm abordado esse fenômeno, seja induzindo uma dependência física através da administração forçada da droga (inalação em uma

câmara, infusão intragástrica, dieta líquida balanceada contendo a droga como única fonte de líquido e alimento), ou da ingestão voluntária por condicionamento operante ou não. Quando o animal desenvolve a dependência física e então, apresenta a síndrome de abstinência quando a droga é retirada, observa-se que o consumo na reapresentação da droga pelos animais dependentes é maior do que pelos não-dependentes, mesmo quando os sintomas da abstinência são brandos. As respostas dos animais ao longo de sessões de abstinência tornam-se mais estáveis, sugerindo que eles aprendem a responder de uma forma controlada para minimizar e evitar os sintomas da abstinência (USDHHS, 2000).

Também se pode avaliar as propriedades reforçadoras negativas das drogas em modelos de aversão condicionada de lugar. Este teste assemelha-se ao já descrito no item anterior como preferência condicionada de lugar, diferindo quanto ao pareamento de estímulos. No modelo de aversão condicionada de lugar pareia-se um ambiente determinado com a manifestação da síndrome de abstinência e o outro ambiente com a ausência da síndrome. Este modelo tem sido descrito na literatura para o estudo dos opiáceos (SHIPPENBERG; KOOB, 2002).

Modelos que consideram os efeitos discriminantes das drogas também têm sido usados para estudar as propriedades reforçadoras negativas. Animais dependentes de diazepam, opiáceo ou álcool foram treinados a discriminar entre salina e pentilenotetrazol, uma droga ansiogênica. Durante a fase de abstinência daquelas drogas para as quais estavam dependentes, os animais generalizaram para as pistas do pentilenotetrazol, sugerindo a presença do componente de ansiedade na abstinência (BRANDT; FRANCE, 1998; EMMETT-OGLESBY et al., 1990).

Modelos para avaliar ansiedade em animais, como o labirinto em cruz elevado, caixa claro-escuro, enterrar objetos, interação social, entre outros, também são empregados para avaliar as propriedades reforçadoras negativas de algumas drogas que causam efeito ansiolítico, como o etanol e o diazepam. Desta forma, pode-se estudar o efeito ansiolítico manifestado após a administração aguda ou crônica destas drogas, além da sua presença na síndrome de abstinência (BOERNGEN-LACERDA; SOUZA-FORMIGONI, 2000).

1.2.3 Modelos de dependência: procura à droga, uso compulsivo e recaída

Durante os últimos 20 anos, foram desenvolvidos novos modelos animais propostos para estudar o *craving* (desejo persistente pelo álcool), a recaída e a perda de controle, que são componentes humanos subjetivos da dependência (HEYMAN, 2000; PHILLIPS, 2002; SHIPPENBERG; KOOB, 2002; SPANAGEL, 2003a).

Um dos critérios para o diagnóstico da dependência é a perda do controle sobre a ingestão da droga. Comportamentos compulsivos e de procura descontrolada da droga podem ocorrer mesmo após longos períodos de abstinência e estão normalmente associados ao uso compulsivo e à recaída.

Modelos de consumo aumentado da droga após exposição prolongada têm permitido estudar a transição entre uso moderado e controlado para uso excessivo e descontrolado. Esses modelos têm sido descritos para cocaína, opiáceos e álcool. Nestes modelos, várias abordagens experimentais têm sido empregadas: auto-administração intravenosa, intracraniana e oral, auto-administração operante ou por livre escolha, ou até administrar previamente de maneira forçada para induzir síndrome de abstinência e então reapresentar a droga para sua auto-administração (AHMED; KOOB, 1998; AHMED; KOOB, 1999; AHMED; WALKER; KOOB, 2000; ROBERTS et al., 2000).

O modelo de condicionamento operante, já descrito, é utilizado nessa abordagem para avaliar o comportamento de procura pela droga, analisando-se a motivação do animal para obter a droga (CUNNIGHAM et al., 2000; TABAKOFF; HOFFMAN, 2000). Primeiramente, os animais são treinados para realizar uma determinada tarefa (normalmente pressionar uma alavanca) para receber a droga. Então, ajusta-se o número de vezes que o animal precisa pressionar a alavanca para receber uma quantidade de droga (taxa de reforço variável) e assim é possível estudar a disposição dos animais em “trabalhar” para conseguir a droga. Depois que os animais aprendem a executar a tarefa, a droga é retirada e os animais, normalmente, param de pressionar a alavanca. Na etapa seguinte, apresenta-se diferentes estímulos aos animais para avaliar se algum deles faz com que o animal recupere seu comportamento de procura pela droga (pressionar a alavanca). O estresse, injeções com pequenas quantidades da droga (*priming*) e estímulos condicionados pareados previamente com a administração da droga são capazes de

gerar a reinstalação do comportamento de procura pela droga. É conhecido que em modelos de condicionamento clássico os estímulos ambientais repetidamente pareados com reforçadores primários podem adquirir propriedades de incentivo (McFARLAND; ETTEMBERG, 1997; SEE et al., 1999; WEISS et al., 2000). Tem sido postulado que esses efeitos reforçadores condicionados contribuiriam para o *craving* pela droga e para a recaída da dependência. Estudos em humanos também têm demonstrado que a apresentação de estímulos previamente associados à droga promove aumento na probabilidade de recaída e também de relatos de *craving* e de motivação para obter a droga demonstrando a analogia desses modelos com o que se observa em humanos (CHILDRESS et al., 1988; O'BRIEN et al., 1992).

Esse tipo de modelo foi inicialmente desenvolvido para auto-administração intravenosa de estimulantes e opióides (AHMED; KOOB, 1998; AHMED; KOOB, 1999; AHMED; WALKER; KOOB, 2000; ALTSHULER; PHILLIPS; FEINHANDLER, 1980) e mais recentemente foi aplicado para a auto-administração oral de álcool (COLOMBO, 1997; COPER; ROMMELSPACHER; WOLFFGRAMM, 1990; CRABBE; WAHLSTEN; DUDEK, 1999). Esses modelos têm sido empregados para estudar possíveis medicamentos anti-*craving* e anti-recaída. No entanto, não se pode afirmar que os animais submetidos a esses modelos estejam verdadeiramente dependentes, uma vez que a resposta que eles exibem para consumir álcool ou outras drogas não é controlada por comportamentos normais do seu repertório (SPANAGEL, 2000).

No modelo de auto-administração por livre-escolha, os animais podem escolher entre água e soluções da droga em diferentes concentrações em suas gaiolas-casas. Após um período prolongado de livre acesso à droga segue uma fase de privação (abstinência) onde os animais permanecem abstinentes por alguns dias ou até semanas. Em seguida, todas as soluções contendo droga são então novamente oferecidas. Este procedimento é repetido várias vezes num período normalmente de um ano (SPANAGEL; HÖLTER, 2000; SPANAGEL, 2000). A reapresentação das soluções da droga leva a um aumento temporário no seu consumo e na preferência que é chamado de efeito da privação da droga. Nessa fase os animais consomem maiores quantidades das soluções da droga da mais alta concentração, ocorre ainda uma alteração no ciclo diário normal dos animais, que passam a ingerir a droga durante a fase clara do dia, na qual os animais costumam permanecer mais inativos.

Também naqueles modelos nos quais os animais precisam executar uma tarefa para receber a droga como recompensa, demonstra-se que o consumo e a preferência pela droga aumentam após uma fase de privação. Os efeitos experimentados durante a fase de privação da droga representam uma situação de aumento da motivação para trabalhar para obtê-la, o que é compatível com a definição de *craving*.

Por último, entre esses modelos, um deles proposto por Wolffgramm e Heyne (1995) e Wolffgramm e colaboradores (2000) será descrito em maiores detalhes, pois o presente trabalho é baseado no mesmo.

Esse modelo utiliza ratos expostos a um paradigma de auto-administração oral por livre escolha. Os animais têm livre acesso à água e a diferentes soluções de etanol com concentrações de 5, 10 e 20 % em suas gaiolas-casas individuais. Esta múltipla escolha é necessária, pois cada rato tende a preferir uma certa concentração e assim, oferecer uma escolha binária entre água e uma única concentração de álcool, por exemplo 10%, poderia levar a resultados enganadores. Inicialmente, o comportamento de ingestão de álcool é exploratório e durante esse período, denominado fase de aquisição, observam-se dias de alto consumo intercalados com dias de quase abstinência. Nessa fase, os ratos experimentam os efeitos psicotrópicos do álcool e ajustam seu comportamento de ingestão.

Na sequência, cada rato desenvolve seu padrão individual de consumo que permanece estável durante vários meses (WOLFFGRAMM, 1990). Esta fase é chamada de fase de consumo controlado. Após 6 meses de acesso contínuo ao álcool, os ratos gradualmente modificam seu padrão sendo que alguns apresentam aumento do consumo nos meses subseqüentes (fase de aumento da demanda). Os animais, então, são submetidos a um longo período de abstinência de 9 meses. Após esse período, eles novamente têm acesso às soluções de álcool. Alguns ratos exibem alto consumo e preferência pelo álcool nesse período de reapresentação.

Além disso, o comportamento aditivo, definido por uma perda de controle sobre a ingestão de álcool, pode ser testado através da adulteração do sabor com quinino que produz um sabor amargo aversivo. Esta adulteração das soluções de álcool reduz substancialmente o consumo nos animais não-adictos, enquanto que, animais adictos reduzem pouco a ingestão de álcool, de modo que seu consumo e

preferência pelo etanol continuam significativamente maiores do que os dos animais controles.

1.4 VALIDAÇÃO DE MODELOS ANIMAIS

Para se utilizar um modelo animal é preciso que o mesmo tenha sido testado quanto a sua validade. A validação de um modelo animal enfoca três aspectos principais: confiabilidade, validade de face e validade preditiva.

A confiabilidade (fidedignidade ou reprodutibilidade) avalia a consistência e estabilidade da variável de interesse obtida no modelo animal. Normalmente é avaliada pela (a) possibilidade de avaliação objetiva; (b) pequena variabilidade intra-sujeito; (c) pequena variabilidade entre-sujeitos; (d) reprodutibilidade sobre condições semelhantes; (e) reprodutibilidade dos efeitos das manipulações (GEYER; MARKOU, 1995).

A validade preditiva refere-se ao quanto os resultados obtidos no modelo animal predizem para humanos as ações e efeitos das drogas assim como verifica se tratamentos eficazes em humanos também são eficazes no modelo. Ou seja, partindo-se de dados obtidos no modelo deve-se ser capaz de prever resultados (eventos) clínicos. Quando um modelo pode fazer previsões sobre a eficácia de um tratamento, se denomina validação farmacológica. Em outras palavras, a validade preditiva informa se uma dada previsão se concretiza.

A validade de face considera o quanto um comportamento (ou condição) exibido pelo animal no modelo em questão se assemelha ao comportamento (ou condição) humano para o problema estudado, no caso a dependência (KOOB, 2000). Para se considerar que um modelo animal tenha validade de face como modelo de dependência é necessário que o mesmo apresente analogia com os critérios diagnósticos estabelecidos no Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais na sua Quarta edição (DSM-IV - APA, 1994), utilizado para o diagnóstico de abuso/dependência em humanos (SHIPPENBERG; KOOB, 2002). O DSM-IV descreve sete critérios diagnósticos do abuso e dependência de drogas para humanos e que podem ser encontrados analogamente em modelos animais. A **tolerância** para os efeitos reforçadores (1) pode ser inferida do consumo aumentado observado em animais dependentes. A **síndrome de abstinência** característica (2) apresenta tanto validade de face como preditiva nos modelos animais. O **desejo**

persistente, *craving*, (3) pode ser modelado através do reforço positivo condicionado com a droga. O consumo da substância em **quantidades maiores do que intencionada** (4) pode ser modelado através do monitoramento da ingestão da droga durante a abstinência e após períodos de abstinência (o “efeito da privação”). O critério de **atividades importantes reduzidas** (5) é difícil de ser modelado em animais, mas alguns experimentos estudando o “custo” da droga, ou seja, o tanto de trabalho que um animal pode fazer para obter a droga, estão sendo realizados. O critério de **muito tempo gasto em atividades necessárias para obter a substância** (6) pode ser modelado em condicionamentos de razão progressiva, nos quais o animal deve trabalhar muito para obter a droga. O último critério, **uso continuado apesar do conhecimento de problemas causados ou exacerbados pela droga** (7), foi modelado em estudos de toxicidade por uso excessivo (*binge*) de cocaína (SHIPPENBERG; KOOB, 2002).

1.5 DROGAS ANTI-CRAVING: ACAMPROSATO E NALTREXONA

O termo *craving* denota um estado mental, criado por anos de uso pesado de álcool, que enfraquece o livre-arbítrio e motiva o alcoólico a continuar o uso do álcool apesar de evidência irrefutável de prejuízo a ele mesmo ou a pessoas próximas dele. A abstinência ao álcool seria uma condição importante para o *craving* inicial e uma memória inapropriada e saliente dos efeitos de recompensa do álcool seria mais importante durante períodos posteriores à abstinência (ANTON, 2001).

Há muito tem se buscado uma substância que reduzisse o *craving* para o álcool. No século XIX, antes da era dos estudos clínicos controlados, o Manual Merck recomendava cocaína para “remover o *craving*” pelo álcool. Outra sugestão era beber água, tão quente quanto possível, antes das refeições, o que removeria o *craving* (ANTON, 2001). Muitos agentes farmacológicos diminuem a ingestão de álcool em animais, porém poucos apresentam eficácia clínica comprovada.

Dois fármacos estão atualmente aprovados para o tratamento do alcoolismo - o acamprosato e a naltrexona – e são chamados de compostos anti-*craving*. O acamprosato (homotaurinato de cálcio) é um derivado do aminoácido de ocorrência natural, taurina. Foi aprovado primeiramente na França em 1989, e mais recentemente, na maioria dos países europeus e da América Latina. Ele se mostrou efetivo em reduzir a recaída ao consumo de etanol tanto em animais como em

humanos, e parece diminuir alguns efeitos da abstinência em humanos (MYRICK et al., 2001, OLIVE et al., 2002).

A farmacologia do acamprosato é ainda pouco entendida, pois se trata de uma molécula com similaridades a vários aminoácidos neuro-ativos e é usado em altas doses. Esses fatores sugerem que ele pode ter múltiplas ações. Atualmente, a melhor explicação para os efeitos do acamprosato parece ser que ele inibe o sistema glutamatérgico envolvido tanto nos efeitos de reforço negativo do álcool quanto na “pseudo-abstinência” condicionada que pode ser importante na recaída induzida por pistas (LITTLETON; ZIEGLGANSBERGER, 2003; SPANAGEL, 2003b).

Tanto estudos pré-clínicos quanto clínicos sugerem que a naltrexona pode ser um agente farmacológico efetivo no tratamento da dependência ao álcool. Após estudos pré-clínicos que sugeriam que a naltrexona poderia ser efetiva, seu potencial valor no tratamento do alcoolismo em humanos foi primeiro avaliado por Volpicelli e colaboradores (1992), o qual usou a naltrexona como um tratamento adjunto à psicoterapia padrão num estudo duplo-cego, usando placebo como controle. Os resultados mostraram que os pacientes tratados com naltrexona relataram níveis mais baixos de *craving*, menos *drinks* consumidos por ocasião, menos dias bebendo, e taxas mais baixas de recaída do que pacientes tratados com placebo. Esses achados foram replicados por O'Malley e colaboradores (1992), que demonstraram que pacientes tratados com naltrexona tiveram taxas mais baixas de recaída e menos dias bebendo. Esses resultados foram confirmados por estudos subsequentes (VOLPICELLI et al., 1997; ANTON et al., 1999; KIEFER et al., 2003; MONTI, 2004). Alguns estudos não encontraram efeitos benéficos, incluindo um estudo multicêntrico que relatou que a naltrexona não era mais efetiva do que o placebo em homens com alcoolismo crônico e grave (KRYSTAL et al., 2001). Porém, a maioria dos estudos têm demonstrado resultados favoráveis sugerindo a naltrexona como uma intervenção farmacológica promissora para o problema do alcoolismo (MONTI, 2004).

Três receptores, denominados μ , δ e κ , medeiam os principais efeitos farmacológicos dos agentes opióides. A naltrexona é um antagonista opióide com grau de afinidade variável para os subtipos de receptores μ , δ e κ , sendo assim denominada de antagonista opióide não seletivo. O envolvimento dos subtipos de receptores opióides sobre o consumo de etanol em animais de laboratório tem sido

investigado através do emprego de agonistas e antagonistas seletivos para cada subtipo de receptor. Há evidências de que um agonista seletivo do receptor κ , U50,488H, atenuaria o consumo voluntário de etanol em ratos (LINDHOLM et al., 2001) e outro agonista seletivo, CI-977 (enadoline), potencializaria o consumo de etanol e a preferência durante o efeito de privação ao álcool em ratos (HOLTER, et al., 2000). Outros autores mostraram que antagonistas seletivos dos receptores μ (CTPO) e δ (naltrindole) reduziram o consumo de etanol em camundongos (KIM, et al., 2000) e ratos (HYYTIA; KIIANMAA, 2001). Outro antagonista seletivo do receptor δ (N,N(CH₃)₂-Dmt-Tic-OH) não se mostrou efetivo em reduzir o consumo de etanol em ratos AA (alcohol-preferring) (INGMAN, et al., 2003).

Embora o mecanismo de controle do consumo de etanol pela naltrexona não esteja completamente compreendido, acredita-se que a sua ligação competitiva aos receptores opióides bloquearia o aumento induzido pelo álcool da atividade do sistema opióide, levando à diminuição do consumo de etanol. Sabe-se que os agonistas opióides fazem recompensa pela desinibição de neurônios dopaminérgicos na ATV (área tegmental ventral), inibindo a liberação do neurotransmissor GABA (ácido gama aminobutírico) por interneurônios gabaérgicos na ATV e SNc (substância negra compacta). Os antagonistas opióides, como a naltrexona, antagonizam essa desinibição, promovendo assim a liberação de GABA, o que leva à redução da liberação de dopamina no núcleo accumbens (SPANAGEL; ZIEGLGÄNSBERGER, 1997). Essa ação pode reduzir os efeitos de estimulação e de reforço positivo do álcool no cérebro, possivelmente diminuindo o *craving* ou a recompensa, e assim reduzir o consumo de álcool (FIELLIN; REID; O'CONNOR, 2000). Outros estudos apóiam a idéia de que a naltrexona, além de diminuir o reforço positivo, aumentaria o efeito aversivo do álcool e, por isso, reduziria o consumo (FROEHLICH et al., 1998).

Resultados preliminares obtidos em nosso laboratório sugerem que é possível desenvolver um modelo animal para dependência de álcool utilizando camundongos semelhante àquele proposto por Wolffgramm e colaboradores usando ratos (WOLFFGRAMM; HEYNE, 1995; WOLFFGRAMM et al., 2000). Os animais submetidos a esse modelo podem ser classificados como dependentes ou não

dependentes. Os animais com perfil de consumo dependente apresentaram preferência pelas soluções etílicas, persistência dos níveis de consumo após abstinência e um consumo não controlado de etanol observado através do beber mesmo em condições aversivas, ou seja, perda de controle. Os animais classificados como não dependentes apresentaram dois perfis de consumo distintos: consumo leve e consumo pesado. Os consumidores com perfil leve demonstraram preferência pela água e pequeno consumo de etanol. Os consumidores com perfil de beber pesado, apesar de apresentarem preferência pelas soluções etílicas, demonstraram redução do consumo de etanol frente a um estímulo aversivo, sugerindo um controle sobre o comportamento de busca pelo etanol.

Nesses estudos prévios, a utilização de camundongos no paradigma de livre escolha tem se mostrado adequada, confiável e com validade de face (RIBEIRO et al., 2004, submetido). Para dar prosseguimento aos estudos de validação, faz-se necessária a validação farmacológica do modelo, que demonstrará o seu valor preditivo, permitindo posteriormente a caracterização de possíveis drogas anti-*craving* e o melhor entendimento dos mecanismos neurobiológicos do comportamento de adição (SPANAGEL; HOLTER, 2000). Para realizá-la é necessário utilizar um agente farmacoterapêutico com eficácia já comprovada em seres humanos. Estudos clínicos demonstraram que o antagonista não seletivo dos receptores opióides, naltrexona, diminui a ingestão de álcool em pacientes de ambulatório detoxificados (VOLPICELLI et al., 1992; O'MALLEY et al., 1992). Os resultados desses ensaios clínicos levaram o FDA (*Food and Drug Administration*) a aprovar a naltrexona em 1994 como um agente farmacoterapêutico para o tratamento da dependência do álcool nos EUA. No Brasil, esse agente também foi aprovado para o tratamento de alcoolismo em 1998.

No modelo para ratos, o experimento completo demora entre 12 e 20 meses. Essa longa duração do procedimento tem altos custos e, assim, seria interessante desenvolver um modelo animal com menor duração. Considerando que o tempo de vida de um rato é cerca de 24 a 36 meses e de um camundongo é de 8 a 12 meses, poder-se-ia desenvolver um modelo similar com camundongos que fosse válido e com menor duração e custo.

2 HIPÓTESE

Um modelo que propõe identificar camundongos que desenvolvem dependência ao álcool deve mimetizar os critérios desse transtorno em humanos, ou seja, apresentar validade de face e preditiva. A primeira fundamenta-se nos comportamentos exibidos pelos animais que seriam análogos aos observados em humanos, ou seja, o consumo de grandes quantidades por longos períodos, a procura pelo álcool e a perda de controle sobre o consumo. A procura e a perda de controle parecem estar relacionadas com o *craving*. O segundo tipo de validação fundamenta-se na capacidade preditiva de uma substância eficaz para o tratamento desse transtorno em humanos também ser eficaz no modelo animal. Assim, teríamos que os animais classificados como “dependentes” após serem submetidos ao modelo de livre escolha, apresentariam redução do consumo de etanol quando tratados com naltrexona, um fármaco utilizado na clínica para tratamento do alcoolismo e que é proposto como medicamento anti-*craving*.

3 OBJETIVOS

Geral:

- Investigar a validação preditiva do modelo de dependência ao etanol por livre escolha, utilizando naltrexona, um fármaco aprovado para o tratamento do alcoolismo em humanos.

Específicos:

- Desenvolver um modelo animal de dependência de etanol para camundongos através de um paradigma de livre escolha num período de tempo relativamente curto.
- Distinguir diferentes padrões de consumo, classificando os animais em consumidores dependentes e não dependentes.
- Avaliar se a suspensão do tratamento crônico com etanol instala a síndrome de abstinência através da análise do comportamento dos animais, quantificando a atividade locomotora e a reação ao medo e comparando-os com valores basais.
- Investigar se a naltrexona altera diferentemente o consumo de etanol em animais classificados como dependente, pesado e leve em um modelo de livre escolha para camundongos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Setenta camundongos machos Swiss, pesando entre 20 e 30g, criados no Biotério da Universidade Federal do Paraná e sem experiência anterior com nenhuma droga ou procedimento, com 45 dias no início do experimento foram alojados individualmente em gaiolas (20 x 30 x 20cm) numa sala com condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro-escuro de 12 h, sendo as luzes acessas a partir das 7 h) e com alimento disponível *ad libitum* (Purina Laboratório, Brasil). Todos os animais eram pesados semanalmente. O experimento teve início depois de um período de uma semana de adaptação ao laboratório. Os animais receberam números (01 a 70) de acordo com a posição da gaiola que ocupavam. Todos os procedimentos de cuidados, manutenção e tratamento foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

4.2 DROGAS

Para a administração oral, as soluções de etanol (P.A 95% Laboratórios Vetec) foram preparadas pela diluição do etanol com água deionizada a 10% e 5% (v/v) a cada dois dias para controlar a evaporação do etanol. No dia que as soluções novas eram preparadas, o líquido remanescente nos frascos individuais de cada animal era medido em provetas sendo, então, descartado. Durante a fase de adulteração, as soluções de etanol eram misturadas com 0,005 g/L de cloreto de quinino (dose essa escolhida de uma curva dose resposta realizada anteriormente no laboratório na qual se avaliou a resposta de aversividade ao sabor amargo causado pelas doses de 0,001, 0,005, 0,01 e 0,05 g/L de quinino) (ver Tabela com a curva dose resposta no apêndice 1). Para o procedimento de validação farmacológica foi usado cloreto de naltrexona (Laboratório Cristália) diluído em água destilada.

4.3 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

4.3.1 Equipamentos e procedimentos

Campo aberto: este equipamento consiste de uma arena com 1 m de diâmetro com piso de madeira pintado em branco e paredes de aço medindo 50 cm de altura. Duas linhas concêntricas e várias linhas pretas dividem o piso formando figuras semelhantes a trapézios com aproximadamente 200 cm² de área cada. Quatro lâmpadas de 100 W são posicionadas a 1 m acima do piso do equipamento. Os camundongos foram colocados individualmente no centro da arena e observados por 3 minutos. Foram cronometrados: o tempo que permaneceu parado inicialmente no centro da arena, o tempo que permaneceu parado ou imobilizado (*Freezing*) no decorrer do teste e o tempo que realizou sua autolimpeza (*Grooming*). Foram contados: o número de figuras de trapézio invadidas, caracterizando a ambulação do animal (considerou-se uma unidade de ambulação quando o animal invadia com as quatro patas cada figura de trapézio), o número de elevações (*Rearing*), ou seja, as vezes que o animal se apoiou nas patas traseiras assumindo a posição vertical. Todas essas variáveis foram medidas em duas ocasiões: antes do início do tratamento de livre escolha (teste basal) e no período de abstinência de etanol. Além dessas, o número de vezes que o animal assumiu uma posição esticada horizontalmente (*Stretch Attend Postures*) tanto no centro como na periferia do aparelho foi observado durante a abstinência.

Labirinto em cruz elevado: equipamento construído em madeira e pintado de cinza, consistindo de duas plataformas dispostas ortogonalmente em cruz, constituindo quatro braços suspensos a 50 cm acima do chão da sala. Dois braços abertos opostos entre si medindo cada um 10 x 50 cm e os outros dois braços, também opostos entre si, com as mesmas medidas, porém, fechados nas suas três faces externas com paredes laterais medindo 40 cm de altura. A sala de observação era iluminada apenas através de luz vermelha. Cada animal era colocado na área central (10 cm²) do labirinto deixando-o explorar o aparelho durante 3 minutos, sendo a latência inicial para entrar em um dos braços cronometrada.. Foram registrados o número de entradas em cada braço (considerava-se uma entrada quando o animal colocava as quatro patas no interior do braço) e o tempo de

permanência em cada braço. Calculou-se também o tempo de permanência na área central do aparelho (tempo total do teste menos o tempo total de permanência nos braços abertos e fechados). Todas essas variáveis foram medidas em duas ocasiões: antes do início do tratamento de livre escolha (teste basal) e no período de abstinência de etanol. Além dessas, no período de abstinência de etanol foi contado o número de vezes que o animal posicionou sua cabeça para fora do braço aberto realizando o movimento de espreita (*Head dipping*) e o número de vezes que o animal tentou entrar em um dos braços do labirinto apenas com as duas patas dianteiras assumindo uma postura esticada (*Stretch Attend Postures*). O número de elevações verticais (*Rearing*) e o tempo de autolimpeza (*Grooming*) também foram registrados para o braço fechado do labirinto.

Caixa de movimentação espontânea: este equipamento é construído de aço e acrílico, medindo 60x20x30 cm, com três paredes em aço escovado e a parede anterior em acrílico transparente escuro. O assoalho é formado por barras de aço de 0,5 cm de diâmetro separadas entre si por 1 cm e o teto é de aço com tampa removível. O animal é colocado no centro da caixa e observado por 3 minutos. Foram cronometrados o tempo de autolimpeza (*Grooming*) e o tempo que o animal permaneceu parado no decorrer do teste. Foram contados o número de elevações verticais (*Rearing*) e o número de cruzamentos de três linhas imaginárias que dividiam o interior da caixa em três setores, determinando o parâmetro ambulação. Essas variáveis foram medidas em duas ocasiões: antes do início do tratamento de livre escolha (teste basal) e durante o período de abstinência de etanol.

O piso dos equipamentos foi cuidadosamente limpo com uma solução de etanol a 5% após o teste com cada animal. O comportamento dos animais foi avaliado por um observador humano dentro da sala de observação num procedimento cego. Todos os procedimentos foram conduzidos no período da tarde (entre 13h e 18 h).

4.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.4.1 Experimento 1: Modelo de dependência por livre escolha

Um grupo de camundongos (n=60) foi exposto ao tratamento durante 10 semanas (fase de livre escolha - LE), com livre acesso às duas soluções de etanol (10% e 5% v/v) e água. Um grupo controle (n=10) teve acesso somente à água. As posições das garrafas foram mudadas a cada dois dias quando o consumo dos líquidos foi medido volumetricamente. Em seguida, as soluções de etanol foram retiradas e somente água foi disponibilizada durante 2 semanas (fase de abstinência - AB). Nas duas semanas seguintes, as soluções de etanol foram novamente oferecidas para restabelecer a livre escolha (fase de reapresentação - RE). Por último, para propiciar um sabor amargo aversivo às soluções de etanol estas foram adulteradas com 0,005 g/L de quinino e foram oferecidas aos animais por mais duas semanas (fase de adulteração - AD). Nada foi adicionado à água durante todo o procedimento experimental. Os animais foram pesados semanalmente.

4.4.2 Experimento 2: Avaliação comportamental

4.4.2.1 Avaliação Comportamental Basal

Após um período de ambientação de 5 dias, foram realizados os primeiros testes comportamentais (teste basal), antes do início do tratamento por livre escolha, de acordo com os procedimentos descritos no item 4.3.1. Vinte e quatro horas após esses testes, os animais foram acondicionados em suas gaiolas individuais e expostos ao tratamento por livre escolha (esquema abaixo).

4.4.2.2 Avaliação Comportamental na Abstinência

A segunda avaliação comportamental dos camundongos foi realizada após aproximadamente 5h da retirada das soluções de etanol (teste na abstinência), sendo os animais novamente submetidos aos mesmos testes descritos no item 4.3.1. Após a avaliação comportamental os animais retornavam às suas gaiolas-casas e eram mantidos sob o regime de abstinência do etanol durante 2 semanas (ver o diagrama do procedimento experimental abaixo).

4.4.3 Experimento 3 – Validação farmacológica do modelo de dependência: tratamento com naltrexona

Para distribuir os animais para o tratamento com naltrexona ou salina, após a primeira semana de adulteração, procedeu-se a uma classificação provisória dos animais de acordo com seu padrão de consumo. A classificação definitiva somente ocorreu quando todos os dados foram completados, ou seja, ao final das duas semanas de adulteração. A classificação dos animais em diferentes padrões requer uma análise minuciosa e extensa, portanto demanda muito tempo e como os animais deveriam iniciar o tratamento com naltrexona/salina logo após o término do procedimento de auto-administração, uma classificação provisória se mostrou necessária. Isto justifica a diferença no número de animais em cada grupo de tratamento que está apresentado e analisado no presente trabalho, porém que não prejudicou a interpretação dos resultados.

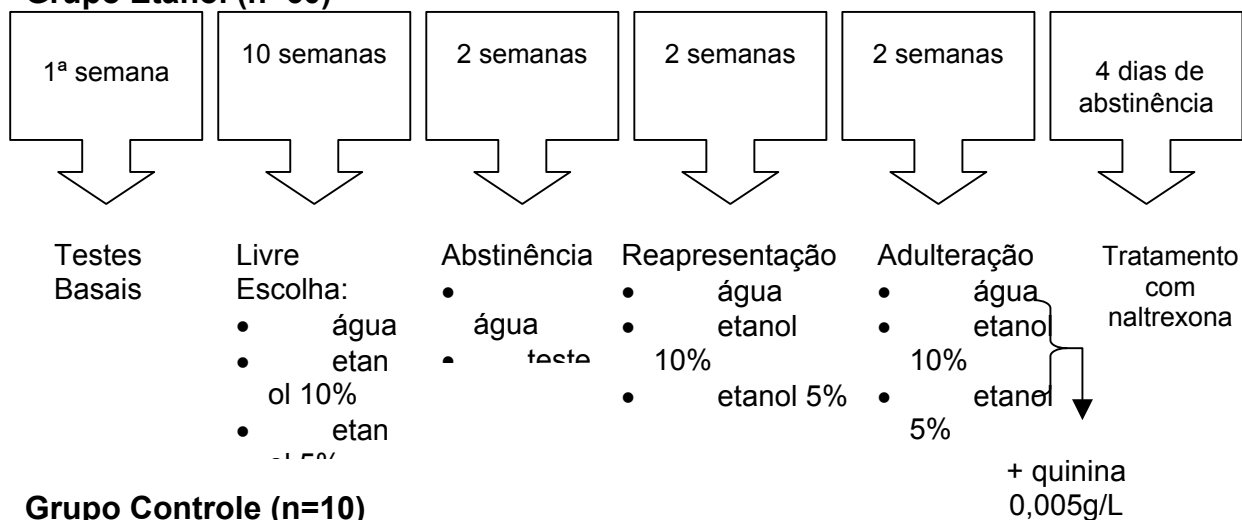
Dessa forma, após todo o procedimento de livre escolha, os 60 animais foram classificados em grupos: dependente, pesado e leve. Após o último dia da fase de adulteração, os animais passaram por 4 dias de abstinência, com acesso somente à água, a fim de aumentar a sua motivação para procurar o álcool. No dia seguinte foi realizada a primeira sessão de injeções. Cada grupo foi então dividido: metade foi designada para receber as doses de naltrexona (0,0 – 0,125 – 2,0 e 16,0 mg/kg i.p.) e a outra metade para receber apenas salina. Os 10 animais do grupo controle foram designados para receber as doses de naltrexona e foram divididos em 2 grupos: metade continuou com acesso somente à água (controle do consumo de líquido – Controle+H₂O) e metade passou a ter acesso à água e às soluções de álcool (controle do efeito da naltrexona sobre o consumo agudo de álcool – Controle+LE).

Cada animal dos grupos designados para tratamento com naltrexona recebeu todas as doses que foram administradas na seguinte ordem: 2,0 – 0,125 – 16,0 mg/kg e a dose de naltrexona 0,0 mg/kg (injeção de salina) foi administrada entre as outras doses utilizando o método de distribuição por quadrado latino. Cada dose foi administrada por dois dias consecutivos e entre as doses foi dado um intervalo de 4 dias durante o qual os animais tiveram acesso somente à água. Os animais do grupo designado para receber salina foram submetidos às mesmas

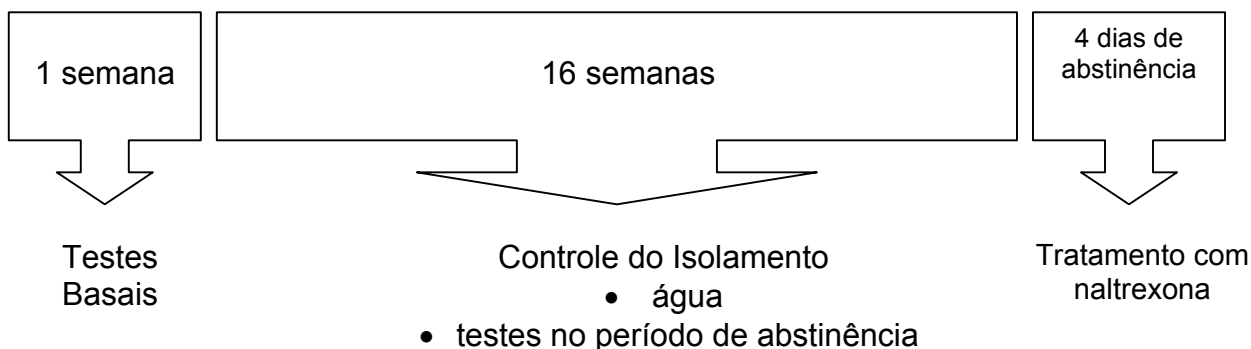
condições e ao mesmo esquema experimental do grupo tratado com naltrexona. O acesso às soluções de etanol e água (livre escolha) foi permitido 30 min após a injeção de naltrexona ou salina. O consumo foi quantificado após 90 min e 24 h do acesso às soluções. Esse procedimento de administração de naltrexona foi baseado no trabalho de Grahame e colaboradores (2000).

DIAGRAMA DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL GERAL

Grupo Etanol (n=60)



Grupo Controle (n=10)



Tratamento com naltrexona

abs	abs	abs	abs	1ª inj	1ª inj	abs	abs	abs	abs	2ª inj	2ª inj
-----	-----	-----	-----	--------	--------	-----	-----	-----	-----	--------	--------

abs	abs	abs	abs	3ª inj	3ª inj	abs	abs	abs	abs	4ª inj	4ª inj
-----	-----	-----	-----	--------	--------	-----	-----	-----	-----	--------	--------

abs: dias em que os animais permaneceram sem acesso ao etanol

inj.: administrações de naltrexona

4.5 CÁLCULO DA QUANTIDADE DE ETANOL CONSUMIDO

O peso corporal em gramas e a ingestão de etanol em mililitros foram usados para computar a quantidade de etanol ingerida em gramas por quilograma de peso corporal do animal (g/kg) aplicando-se a fórmula abaixo. Os coeficientes utilizados foram calculados a partir da densidade do álcool.

$$Q \text{ (g/kg/dia)} = (v_{10\%} \times 0,075 + v_{5\%} \times 0,0375) / p \times 1000$$

Q = quantidade de álcool consumida diariamente em g/kg do animal

v_{10%} = volume consumido diariamente da solução de etanol a 10% (v/v)

v_{5%} = volume consumido diariamente da solução de etanol a 5% (v/v)

p = peso do animal, em gramas, avaliado semanalmente

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O consumo de etanol ou de água foi expresso por média diária por semana e erro padrão. Foram utilizadas análises de variância de uma e duas vias seguidas por teste de Newman-Keuls para comparar os grupos quanto à preferência entre etanol e água, quanto ao consumo de etanol ou água em cada fase experimental e quanto aos parâmetros comportamentais obtidos no campo aberto, caixa de movimentação e labirinto em cruz elevado. Foi realizada também análise de variância para medidas repetidas para comparar o consumo de álcool ou de água ao longo das fases ou etapas experimentais (experimentos 1 e 3) em cada grupo. Também foi utilizada análise de variância para medidas repetidas para comparar os consumos diários de etanol ao longo das fases para cada animal utilizando-se as medidas de consumo diário durante duas semanas em cada fase, ou seja, 14 medidas na fase de livre escolha (LE), compreendendo as últimas 2 semanas desta fase, 14 medidas na fase de reapresentação (RE) e 14 medidas na fase de adulteração (AD). Teste “t” de Student para amostras dependentes foi empregado para comparar as medidas comportamentais obtidas nos testes basal e na abstinência para cada grupo. Teste “t” de Student para amostras independentes foi usado para comparar o consumo de etanol com o de água para cada grupo para

analisar a preferência por um tipo de líquido. Análise de correlação de Pearson foi realizada para o consumo de etanol entre duas diferentes fases experimentais. O programa estatístico utilizado para as análises foi o STATISTICA (Statsoft-CSS). As diferenças encontradas foram consideradas significantes quando $p \leq 0,05$ pelo menos.

5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1: MODELO DE DEPENDÊNCIA POR LIVRE ESCOLHA

5.1.1 Padrão Geral de Consumo

Durante a fase de livre escolha, observou-se que, nas primeiras semanas, os camundongos apresentaram consumo variável ao longo dos dias, tornando-se estável nas últimas 4 semanas dessa fase. Uma análise dos índices de correlação detectou valores positivos e significantes a partir da 7^a semana ($r=0,94$). Como o consumo de etanol se estabilizou a partir da 7^a semana e para igualar o número de medidas do consumo nas diferentes fases utilizou-se 2 semanas para cada fase experimental, ou seja, as 2 últimas semanas de livre escolha, 2 semanas de reapresentação e 2 semanas de adulteração, para realizar os estudos de correlação entre os consumos de etanol nas diferentes fases.

Foram detectadas correlações positivas e significantes entre o consumo de etanol nas 2 últimas semanas da livre escolha e o consumo de etanol nas 2 semanas de reapresentação e nas 2 semanas de adulteração. Não foi detectada correlação significativa entre o consumo de etanol nas 2 últimas semanas de livre escolha e o consumo de água durante as 2 semanas de abstinência (figura 1).

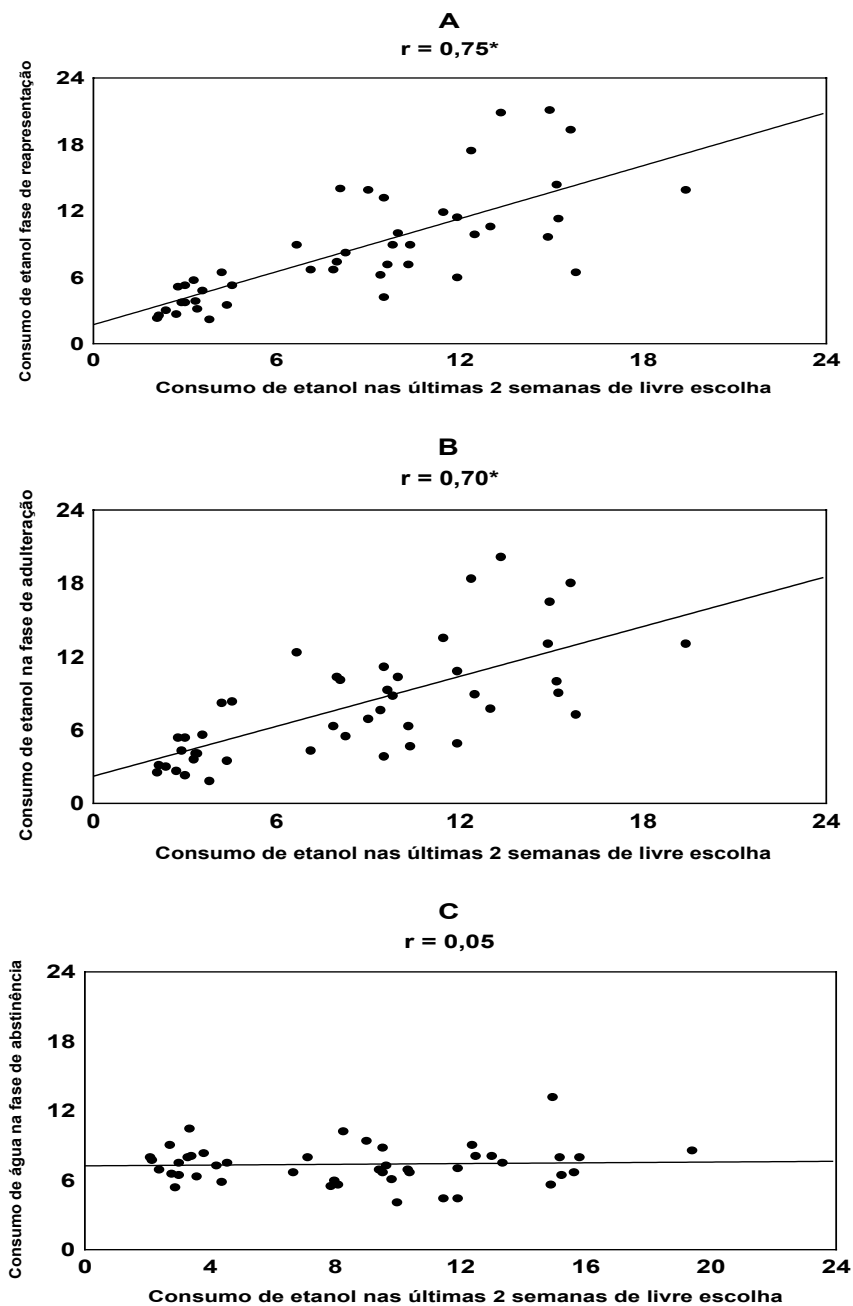


FIGURA 1 – CORRELAÇÕES ENTRE OS CONSUMOS NAS DIFERENTES FASES DO MODELO: Os pontos representam cada animal com suas respectivas médias de consumo de etanol (g/kg) nas últimas duas semanas de livre escolha e nas outras fases experimentais (A: fase de reapresentação; B: fase de adulteração; C: consumo de água na fase de abstinência). * correlação de Pearson significativa ($p \leq 0,05$).

5.1.2 Padrão Individual de Consumo

O consumo individual de etanol (g/kg) em cada fase experimental e a preferência entre etanol e água foram utilizados para classificar os animais em três grupos: animais com perfil de consumidor dependente (D), animais com perfil de consumidor pesado (P) e animais com perfil de consumidor leve (L). Como já mencionado, não foram utilizadas todas as semanas da fase de livre escolha para a média do consumo dessa fase devido à grande variabilidade apresentada pelos animais no início do tratamento (fase de aquisição). Observou-se que nas últimas quatro semanas desse período o consumo se estabilizou permitindo melhor confiabilidade para análises posteriores. Para comparar o consumo dos animais entre as diferentes fases do modelo pela ANOVA, igualou-se o número de medidas do consumo nas diferentes fases, utilizando-se 2 semanas em cada fase. Dessa forma, a comparação entre o consumo de etanol nas diferentes fases considerou na fase de livre escolha as últimas duas semanas, na fase de reapresentação as duas semanas após a abstinência e na fase de adulteração, as duas semanas seguintes à fase de reapresentação, totalizando 14 medidas de consumo em cada fase para cada animal.

Foram encontrados quinze animais com perfil de consumidor dependente (D, n=15), quatorze animais com perfil de consumidor pesado (P, n=14) e dezesseis com perfil de consumidor leve (L, n=16). Dois animais morreram durante o experimento e treze animais foram excluídos da análise por não se enquadrarem em nenhum padrão definido (ver apêndice 2).

Grupo Dependente

Todos os animais do grupo com perfil de consumidor dependente apresentaram as seguintes características: consumo de etanol (g/kg) alto e sem redução significativa na fase de adulteração comparada com a livre escolha e preferência pelo etanol em relação à água em todas as fases experimentais. O consumo de etanol deste grupo variou entre 7,00 e 18,13 g/kg (média \pm dp = 12,05 \pm 3,64), considerando todas as fases juntas (sem 9-16) e pode-se observar as seguintes características individuais (tabela 1):

- Consumo de etanol (g/kg) foi significativamente inferior durante as últimas duas semanas de livre escolha quando comparado com o das fases posteriores (animais: 10, 13 e 18).
- Aumento significativo do consumo de etanol (g/kg) durante a reapresentação, e na adulteração o consumo não foi inferior ao das últimas duas semanas de livre escolha (animais: 02, 26 e 33).
- Aumento significativo do consumo de etanol (g/kg) durante a adulteração comparado com o das fases anteriores (animal 25).
- Consumo de etanol (g/kg) alto, porém sem alterações ao longo do experimento (animais: 16, 20, 29, 30, 34 e 36).
- Consumo de etanol (g/kg) significativamente maior durante as últimas duas semanas de livre escolha comparado com o da fase de reapresentação, mas sem diminuição significativa no consumo durante a adulteração comparado com o das últimas duas semanas da livre escolha (animais: 24 e 53).

Para a determinação da preferência pelas soluções etílicas comparou-se a média do consumo de etanol com o consumo de água para cada animal durante a livre escolha ($t_2 = 4,76$, $t_{10} = 22,22$, $t_{13} = 9,25$, $t_{16} = 3,26$, $t_{18} = 49,78$, $t_{20} = 3,58$, $t_{24} = 20,63$, $t_{25} = 25,44$, $t_{26} = 5,76$, $t_{29} = 16,83$, $t_{30} = 30,14$, $t_{33} = 29,25$, $t_{34} = 33,49$, $t_{36} = 15,09$, $t_{53} = 21,52$, teste “t” de Student para amostras independentes $p \leq 0,05$).

As figuras 2 a 6 representam os padrões de consumo individual para os animais do grupo dependente, com os volumes das soluções consumidas (água, etanol 5% e etanol 10%) e o volume total de etanol (soma dos volumes das soluções etílicas).

TABELA 1 – PADRÃO INDIVIDUAL DE CONSUMO DE ETANOL DO GRUPO DEPENDENTE E PREFERÊNCIA ENTRE ETANOL E ÁGUA PARA CADA FASE EXPERIMENTAL.

Grupo	Animal	Livre escolha N [#] =14		Reapresentação N=14		Adulteração N=14		ANOVA consumo individual de etanol entre as fases	
		etanol (g/kg/dia)	Pref.	etanol (g/kg/dia)	Pref.	etanol (g/kg/dia)	Pref.	F(2, 40)	p ≤
NTX	10	13,3 ± 0,30	E	20,9 ± 0,82 ^a	E	19,6 ± 1,16 ^a	E	26,29	0,0001
	16	7,9 ± 0,77	E	6,8 ± 0,44	S	6,4 ± 0,30	S	1,89	0,20
	18	12,4 ± 0,44	E	17,5 ± 0,75 ^a	E	17,9 ± 0,80 ^a	E	21,35	0,0001
	24	14,9 ± 0,50	E	9,7 ± 0,52 ^{a,c}	E	13,1 ± 1,04	E	13,58	0,0001
	25	8,0 ± 0,27	E	7,4 ± 0,56	S	10,4 ± 0,90 ^{a,b}	E	6,19	0,01
	26	15,8 ± 0,37	E	21,2 ± 1,05 ^{a,c}	E	16,5 ± 1,73	S	5,84	0,01
	33	8,1 ± 0,23	E	11,9 ± 1,55 ^a	E	10,2 ± 0,93	E	3,86	0,05
Salina	2	9,5 ± 0,48	E	13,3 ± 0,85 ^{a,c}	E	10,9 ± 1,03	E	5,96	0,01
	13	6,6 ± 0,23	E	8,9 ± 0,39 ^{a,c}	E	12,1 ± 0,88 ^{a,b}	E	25,26	0,0001
	20	9,7 ± 0,42	E	9,0 ± 1,09	E	8,9 ± 0,81	S	0,33	0,80
	29	11,5 ± 0,44	E	12,0 ± 1,23	E	13,6 ± 1,19	E	1,27	0,30
	30	15,7 ± 0,50	E	17,5 ± 1,63	E	18,0 ± 1,02	E	1,43	0,30
	34	11,9 ± 0,27	E	11,5 ± 0,32	E	10,9 ± 0,37	E	2,71	0,10
	36	10,0 ± 0,18	E	10,0 ± 0,56	E	10,4 ± 0,57	E	0,23	0,80
	53	9,6 ± 0,34	E	7,3 ± 0,64 ^{a,c}	S	9,4 ± 0,51	E	6,61	0,01

NOTA: O consumo de etanol está expresso como média ± erro padrão do consumo diário durante as semanas de cada fase (livre escolha: últimas 2 semanas antes da abstinência; reapresentação: 2 semanas após a abstinência; adulteração: 2 semanas seguintes à reapresentação). A preferência está expressa como Pref.: A – preferência pela água, E – preferência pelo etanol, S – sem preferência. Na coluna da direita estão os valores de F para análise de variância (ANOVA) de uma via para o consumo individual de etanol e os respectivos valores de p. ^a diferente da fase de livre escolha; ^b diferente da fase de reapresentação; ^c diferente da fase de adulteração (p ≤ 0,05 pelo menos, Newman-Keuls). # “N” representa o número de medidas diárias do consumo total de etanol para cada animal. NTX: animais do grupo dependente que receberam naltrexona no experimento 3. Salina: animais do grupo dependente que receberam salina no experimento 3.

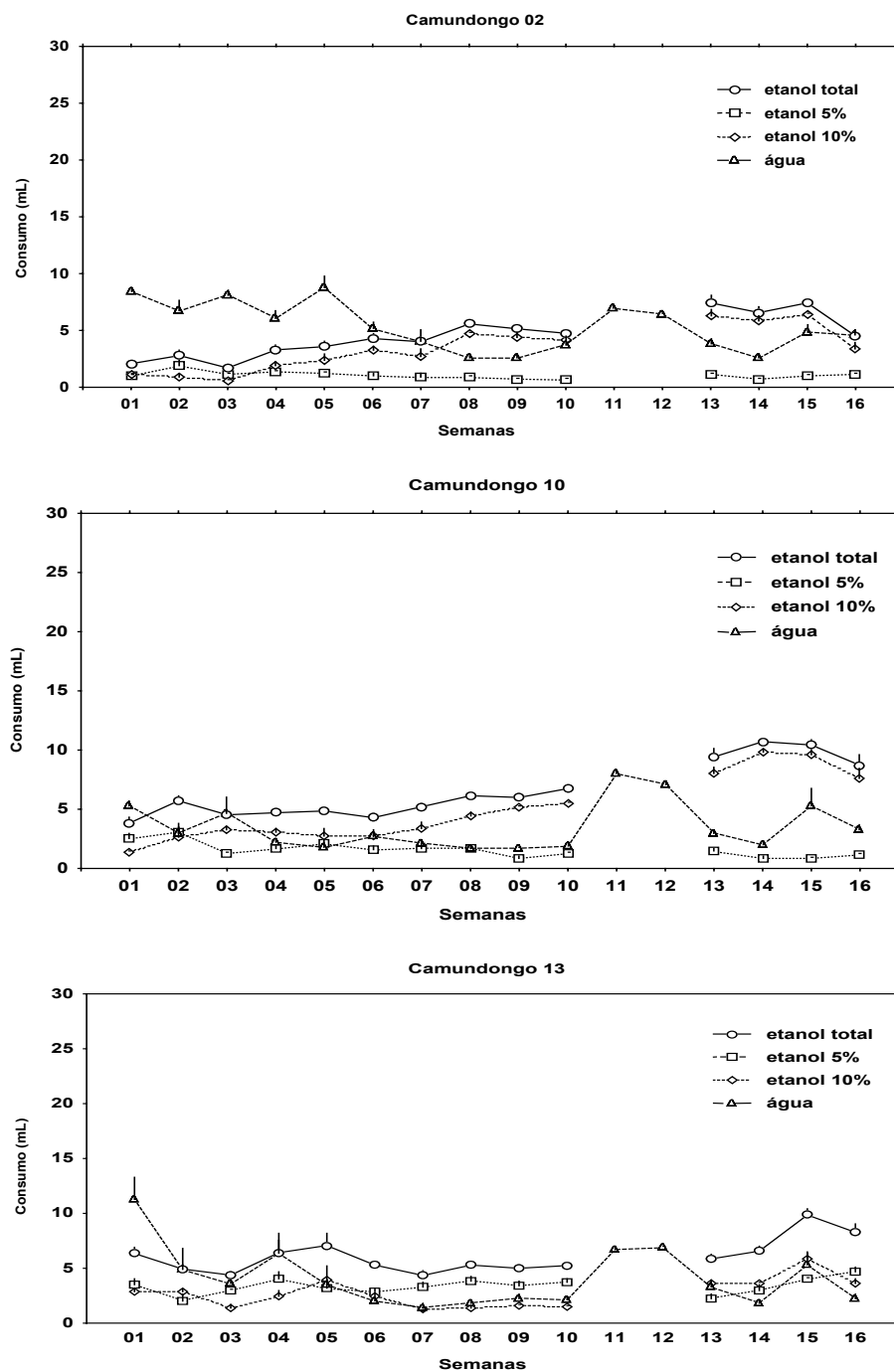


FIGURA 2 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 2, 10 E 13 DO GRUPO D: Consumo de etanol e água ao longo das fases expresso em média \pm erro padrão do consumo diário semanal (mL) (1-10: semanas da fase de livre escolha, 11-12: semanas da fase de abstinência, 13-14: semanas da fase de reapresentação, 15-16: semanas da fase de adulteração).

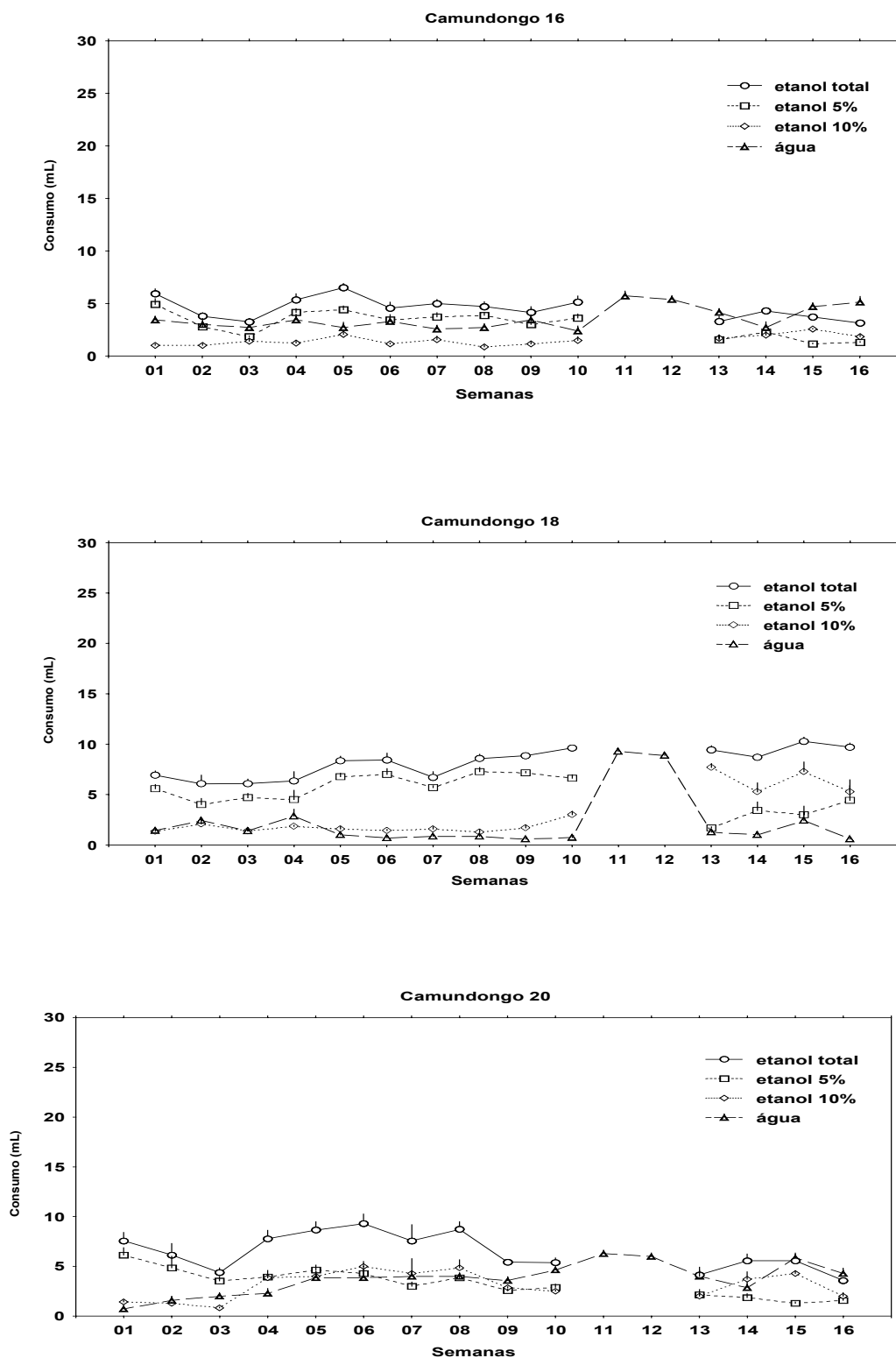


FIGURA 3 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 16, 18 E 20 DO GRUPO D: Consumo de etanol e água ao longo das fases expresso em média \pm erro padrão do consumo diário semanal (mL) (1-10: semanas da fase de livre escolha, 11-12: semanas da fase de abstinência, 13-14: semanas da fase de reapresentação, 15-16: semanas da fase de adulteração).

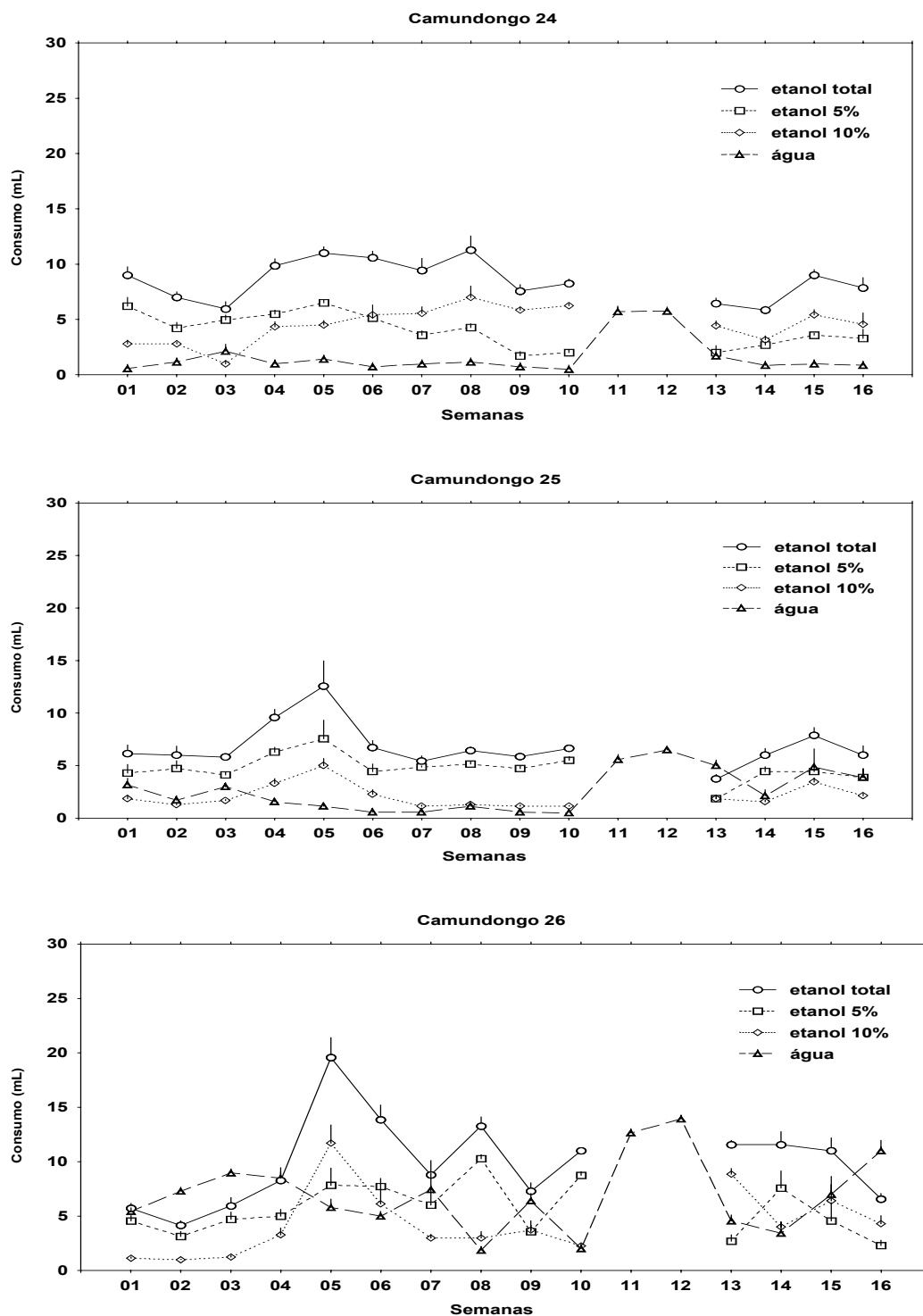


FIGURA 4 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 24, 25 E 26 DO GRUPO D: Consumo de etanol e água ao longo das fases expresso em média \pm erro padrão do consumo diário semanal (mL) (1-10: semanas da fase de livre escolha, 11-12: semanas da fase de abstinência, 13-14: semanas da fase de reapresentação, 15-16: semanas da fase de adulteração).

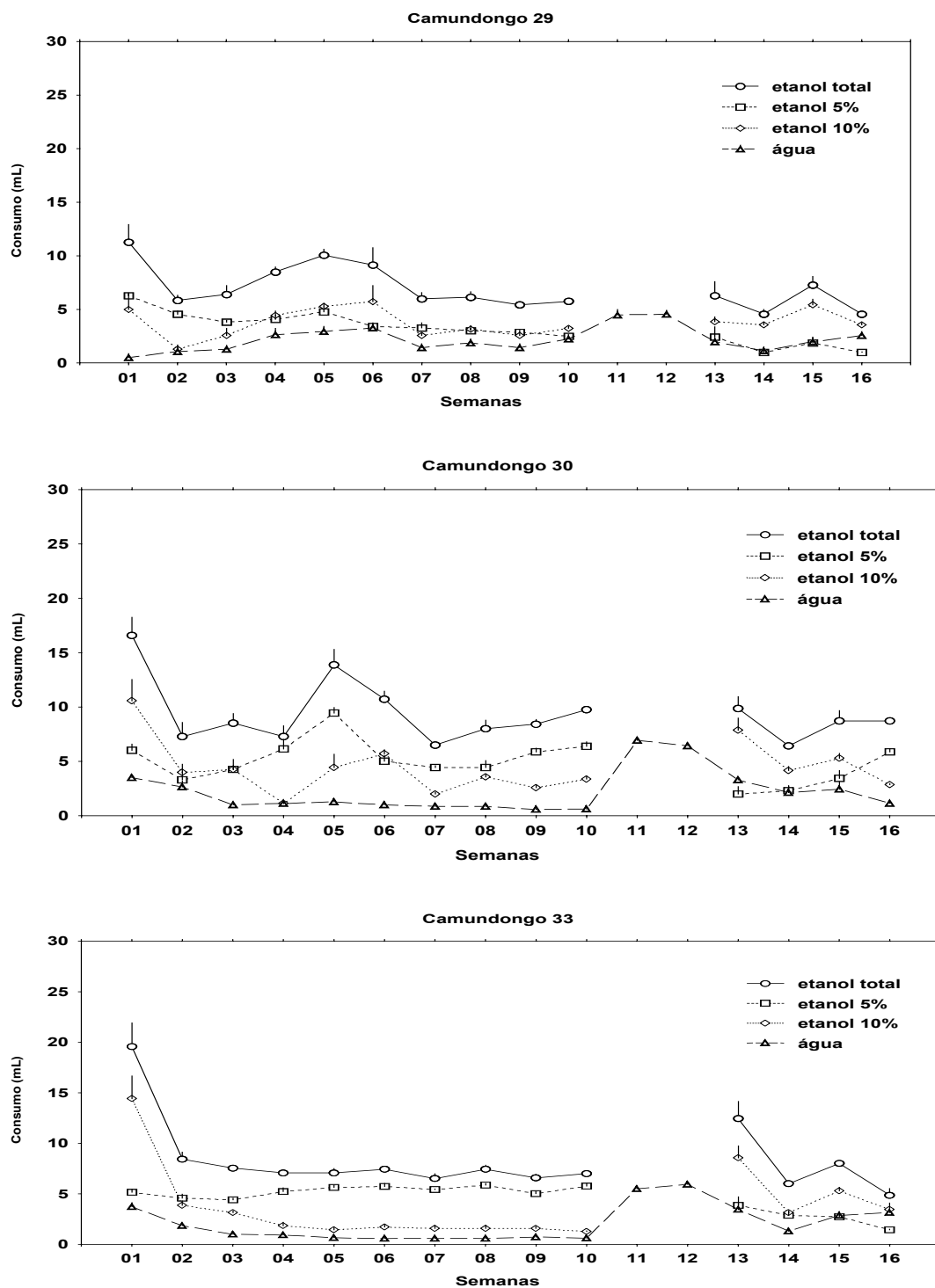


FIGURA 5 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 29, 30 E 33 DO GRUPO D: Consumo de etanol e água ao longo das fases expresso em média \pm erro padrão do consumo diário semanal (mL) (1-10: semanas da fase de livre escolha, 11-12: semanas da fase de abstinência, 13-14: semanas da fase de reapresentação, 15-16: semanas da fase de adulteração).

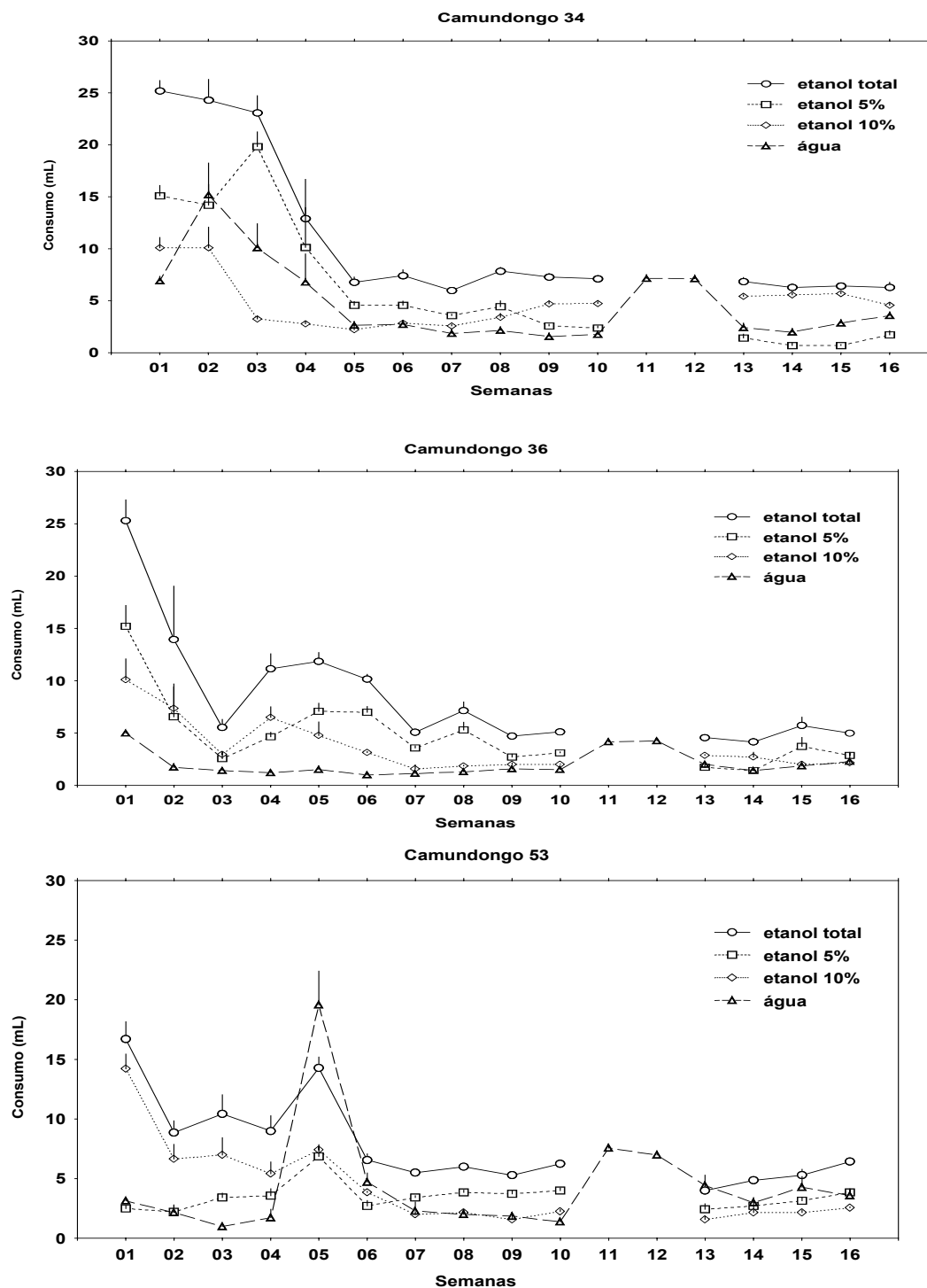


FIGURA 6 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 34, 36 E 53 DO GRUPO D: Consumo de etanol e água ao longo das fases expresso em média \pm erro padrão do consumo diário semanal (mL) (1-10: semanas da fase de livre escolha, 11-12: semanas da fase de abstinência, 13-14: semanas da fase de reapresentação, 15-16: semanas da fase de adulteração).

Grupo Pesado

Os camundongos do grupo com perfil de consumidor pesado demonstraram o seguinte padrão de consumo: preferência pelo etanol em relação à água na fase de livre escolha e consumo de etanol (g/kg) elevado, porém com redução significativa na fase de adulteração comparado com o da livre escolha. O consumo de etanol deste grupo variou entre 5,91 e 15,46 g/kg (média \pm dp = $9,43 \pm 2,74$) ao longo de todas as fases. Neste grupo observou-se as seguintes características individuais (tabela 2):

- Redução significativa do consumo de etanol (g/kg) durante a adulteração quando comparado com o da livre escolha e da reapresentação (animais 50, 56, 59).
- Redução significativa do consumo de etanol durante a reapresentação e adulteração comparados com o da livre escolha (animais 17, 28, 31, 32, 37, 39, 48, 49).
- Redução significativa do consumo de etanol durante a reapresentação comparado com o da livre escolha e durante a adulteração comparado com o das fases anteriores (animais 11, 22).
- Aumento significativo do consumo de etanol (g/kg) durante a reapresentação, porém com redução significativa na fase de adulteração comparado ao consumo nas fases anteriores (animal 35).

Para a determinação da preferência pelas soluções etílicas comparou-se a média do consumo de etanol com o consumo de água para cada animal durante a livre escolha, revelando os seguintes valores pelo teste “t” de Student: $t_{11} = 25,86$, $t_{17} = 41,75$, $t_{22} = 24,78$, $t_{28} = 24,25$, $t_{31} = 25,87$, $t_{32} = 20,84$, $t_{35} = 29,99$, $t_{37} = 19,76$, $t_{39} = 29,63$, $t_{48} = 19,29$, $t_{49} = 18,73$, $t_{50} = 7,92$, $t_{56} = 3,14$, $t_{59} = 22,68$ (teste “t” de Student para amostras independentes $p \leq 0,05$).

As Figuras 7 a 11 representam os padrões de consumo individual para os animais do grupo pesado, com os volumes das soluções consumidas (água, etanol 5% e etanol 10%) e o volume total de etanol (soma dos volumes das soluções etílicas).

TABELA 2 – PADRÃO INDIVIDUAL DE CONSUMO DE ETANOL DO GRUPO PESADO E PREFERÊNCIA ENTRE ETANOL E ÁGUA PARA CADA FASE EXPERIMENTAL.

Grupo	Animal	Livre escolha N [#] =14		Reapresentação N=14		Adulteração N=14		ANOVA consumo individual de etanol entre as fases	
		etanol (g/kg/dia)	Pref.	etanol (g/kg/dia)	Pref.	etanol (g/kg/dia)	Pref.	F(2, 40)	p ≤
NTX	22	15,2 ± 0,48	E	11,4 ± 0,56 ^{a,c}	E	9,1 ± 1,11 ^{a,b}	S	16,81	0,0001
	31	15,1 ± 0,55	E	11,1 ± 1,29 ^a	E	10,0 ± 0,88 ^a	E	9,67	0,001
	35	9,0 ± 0,38	E	11,9 ± 0,78 ^{a,c}	E	6,2 ± 0,38 ^{a,b}	S	27,29	0,0001
	37	11,9 ± 0,25	E	6,0 ± 0,45 ^a	E	5,0 ± 0,40 ^a	A	104,83	0,0001
	48	9,4 ± 0,31	E	6,3 ± 0,45 ^{a,c}	E	7,7 ± 0,65 ^{a,b}	E	10,91	0,001
	49	10,3 ± 0,23	E	7,2 ± 0,44 ^a	E	6,4 ± 0,09 ^a	E	51,72	0,0001
	50	8,3 ± 0,51	E	8,3 ± 0,97	E	5,5 ± 0,45 ^{a,b}	A	5,45	0,01
	56	7,1 ± 0,34	E	6,3 ± 0,48	S	4,4 ± 0,34 ^{a,b}	A	13,06	0,0001
	59	10,4 ± 0,22	E	9,0 ± 1,18	S	4,7 ± 0,71 ^{a,b}	A	13,95	0,0001
Salina	11	13,0 ± 0,38	E	10,6 ± 0,85 ^{a,c}	S	7,5 ± 0,89 ^{a,b}	A	14,63	0,0001
	17	12,5 ± 0,20	E	9,9 ± 0,92 ^a	E	9,0 ± 0,46 ^a	S	9,62	0,001
	28	15,8 ± 0,54	E	6,5 ± 1,07 ^a	A	7,4 ± 1,02 ^a	A	33,21	0,0001
	32	19,3 ± 0,78	E	12,4 ± 1,20 ^a	S	13,1 ± 1,27 ^a	A	12,44	0,0001
	39	9,5 ± 0,32	E	4,3 ± 0,57 ^a	A	4,0 ± 0,46 ^a	A	46,30	0,0001

NOTA: O consumo de etanol está expresso como média ± erro padrão do consumo diário durante as semanas de cada fase (livre escolha: últimas 2 semanas antes da abstinência; reapresentação: 2 semanas após a abstinência; adulteração: 2 semanas seguintes à reapresentação).. A preferência está expressa como Pref.: A – preferência pela água, E – preferência pelo etanol, S – sem preferência. Na coluna da direita estão os valores de F para análise de variância (ANOVA) de uma via para o consumo individual de etanol e os respectivos valores de p. ^a diferente da fase de livre escolha; ^b diferente da fase de reapresentação; ^c diferente da fase de adulteração (p≤0,05 pelo menos, Newman-Keuls). # “N” representa o número de medidas diárias do consumo total de etanol para cada animal. NTX: animais do grupo pesado que receberam naltrexona no experimento 3. Salina: animais do grupo pesado que receberam salina no experimento 3.

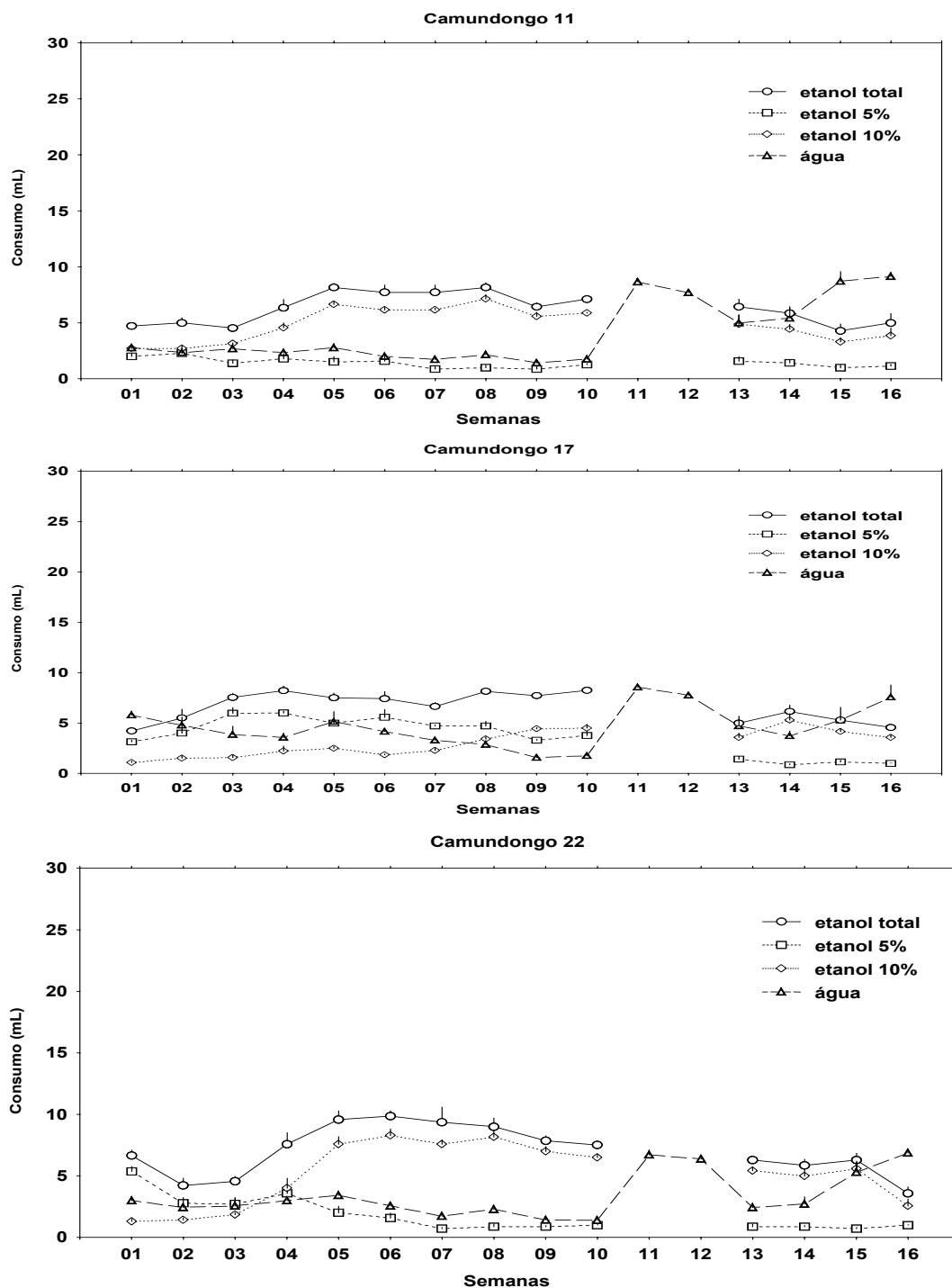


FIGURA 7 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 11, 17 E 22 DO GRUPO P: Consumo de etanol e água ao longo das fases expresso em média \pm erro padrão do consumo diário semanal (mL) (1-10: semanas da fase de livre escolha, 11-12: semanas da fase de abstinência, 13-14: semanas da fase de reapresentação, 15-16: semanas da fase de adulteração).

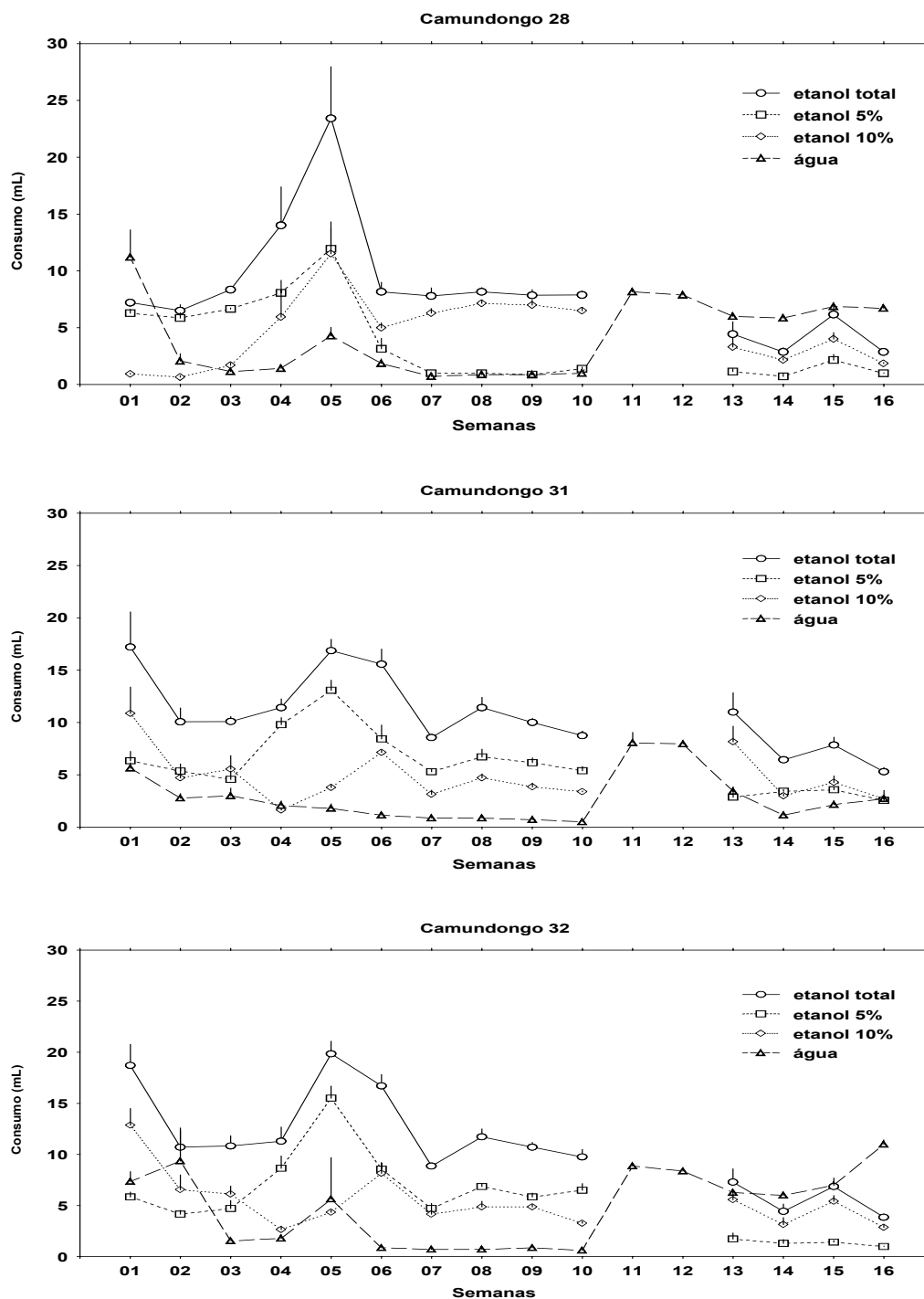


FIGURA 8 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 28, 31 E 32 DO GRUPO P: Consumo de etanol e água ao longo das fases expresso em média \pm erro padrão do consumo diário semanal (mL) (1-10: semanas da fase de livre escolha, 11-12: semanas da fase de abstinência, 13-14: semanas da fase de reapresentação, 15-16: semanas da fase de adulteração).

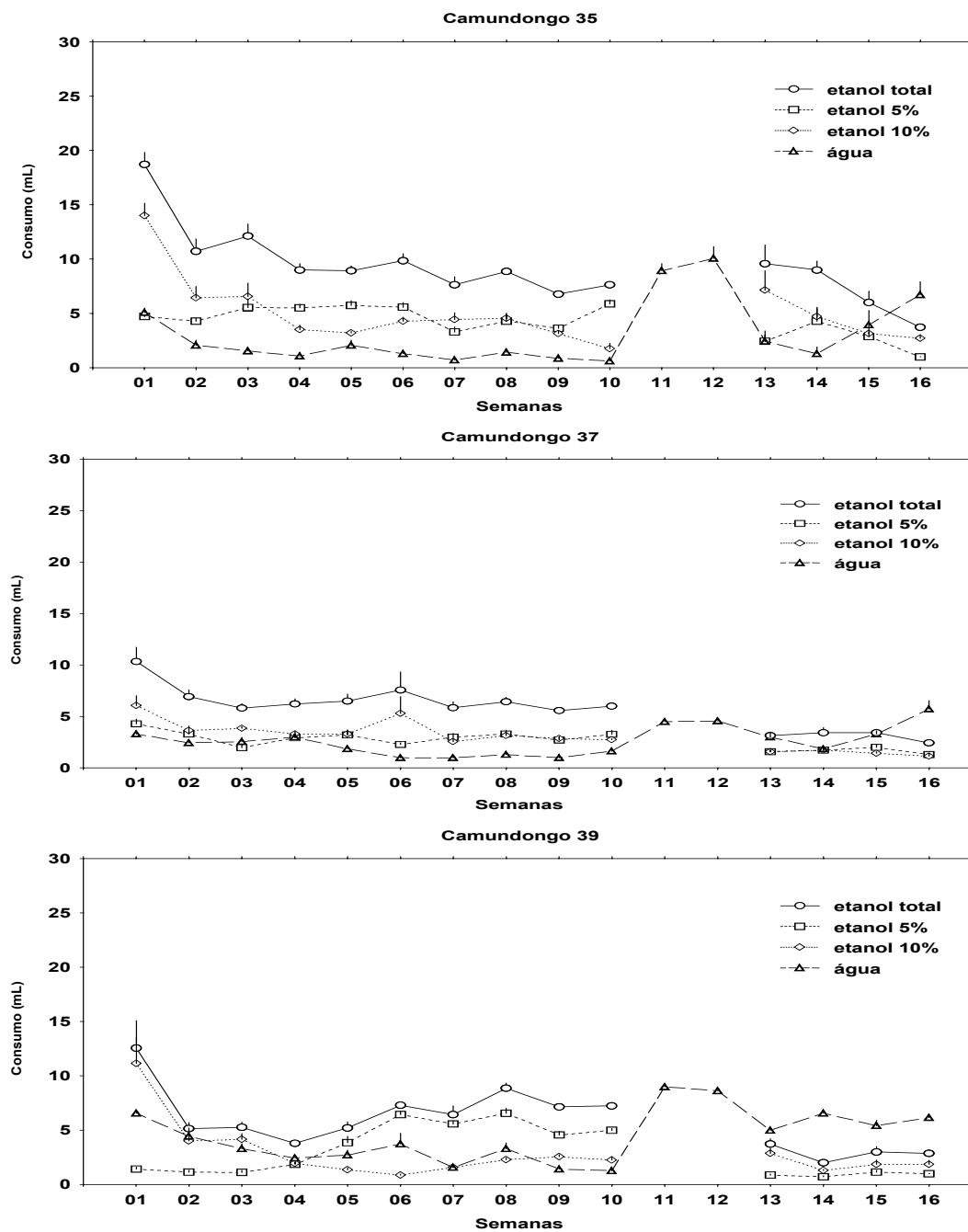


FIGURA 9 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 35, 37 E 39 DO GRUPO P: Consumo de etanol e água ao longo das fases expresso em média \pm erro padrão do consumo diário semanal (mL) (1-10: semanas da fase de livre escolha, 11-12: semanas da fase de abstinência, 13-14: semanas da fase de reapresentação, 15-16: semanas da fase de adulteração).

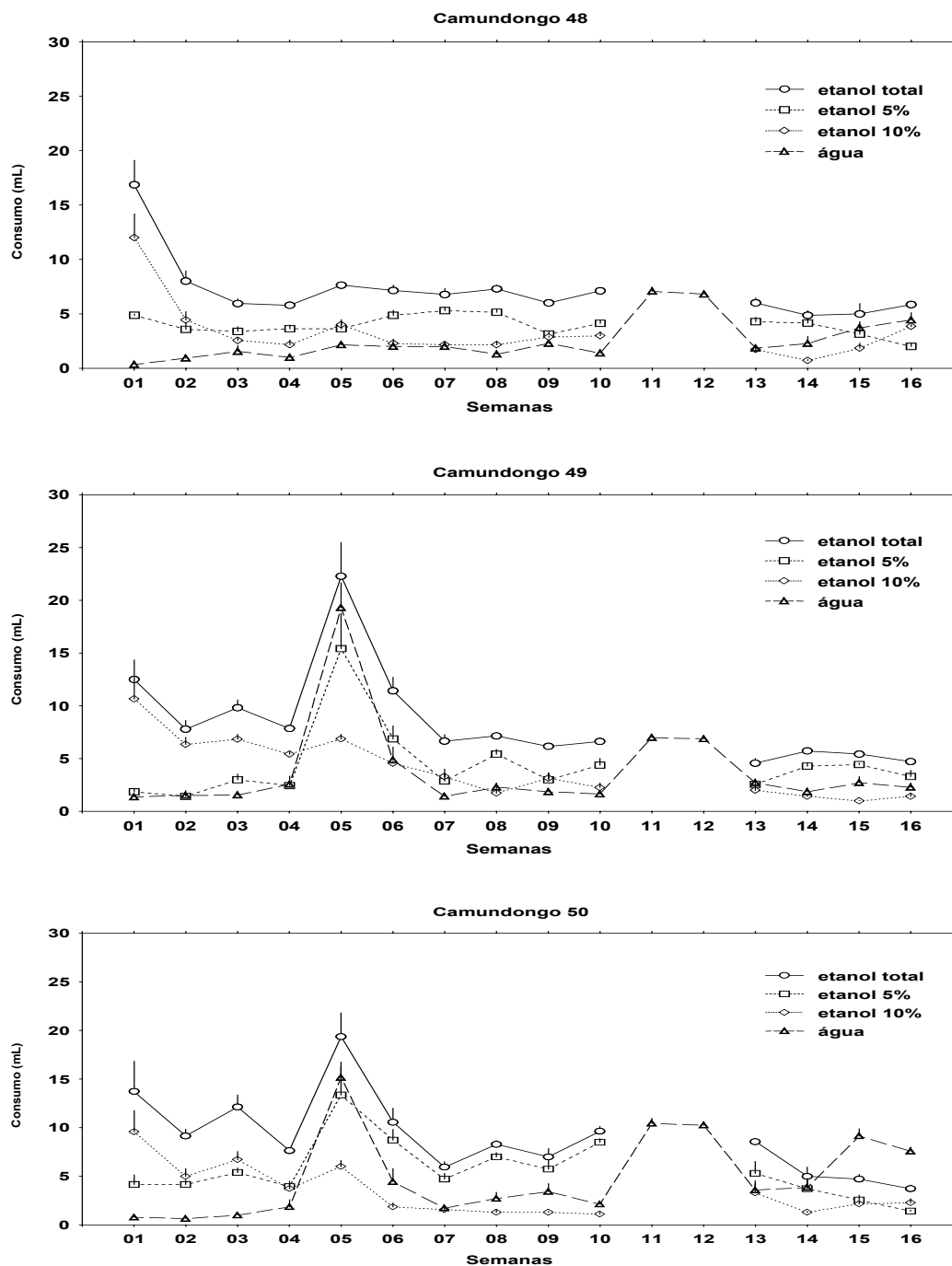


FIGURA 10 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 48, 49 E 50 DO GRUPO P: Consumo de etanol e água ao longo das fases expresso em média \pm erro padrão do consumo diário semanal (mL) (1-10: semanas da fase de livre escolha, 11-12: semanas da fase de abstinência, 13-14: semanas da fase de reapresentação, 15-16: semanas da fase de adulteração).

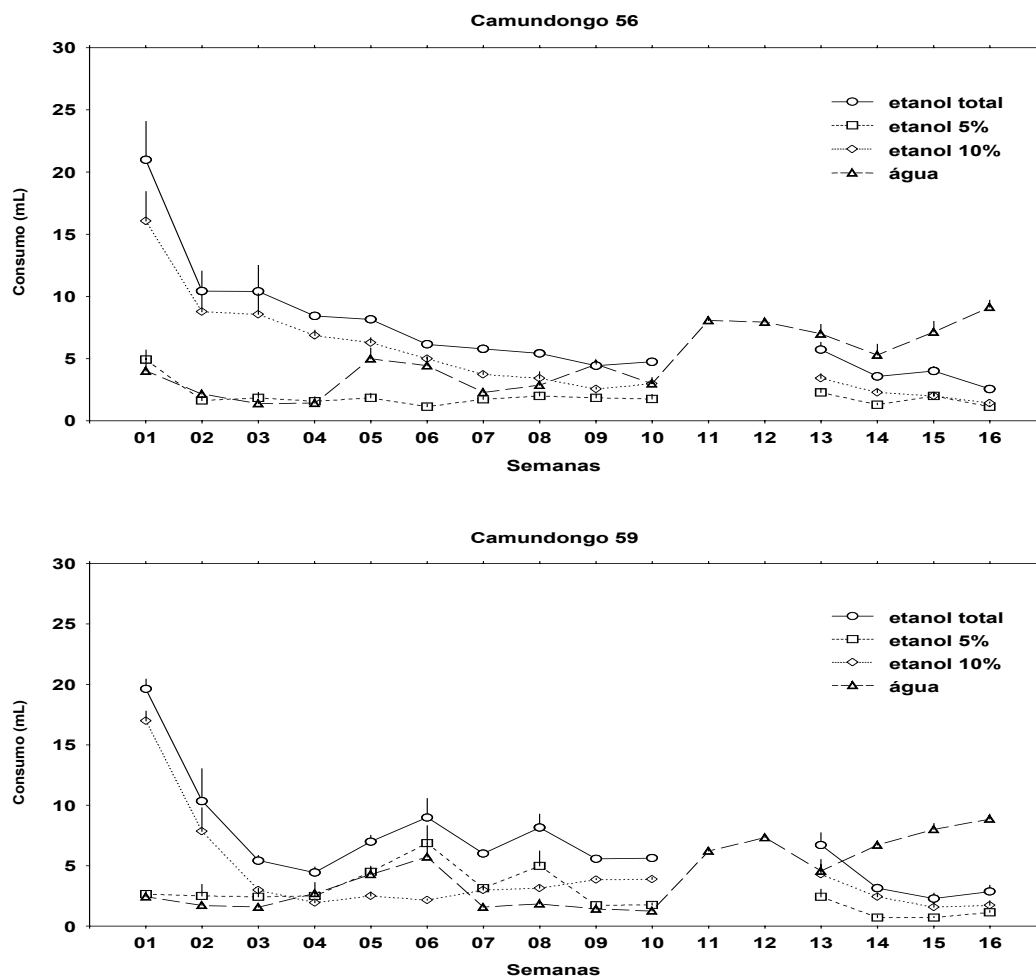


FIGURA 11 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 56 E 59 DO GRUPO P: Consumo de etanol e água ao longo das fases expresso em média \pm erro padrão do consumo diário semanal (mL) (1-10: semanas da fase de livre escolha, 11-12: semanas da fase de abstinência, 13-14: semanas da fase de reapresentação, 15-16: semanas da fase de adulteração).

Grupo Leve

Todos os animais do grupo com perfil de consumidor leve apresentaram as seguintes características: preferência pela água em relação ao etanol em todas as fases experimentais e consumo de etanol (g/kg) relativamente baixo ao longo de todo o modelo. O consumo de etanol destes animais variou entre 2,34 e 6,29 g/kg (média \pm dp = $3,83 \pm 1,18$) em todas as fases. Os padrões individuais de consumo de etanol foram os seguintes (tabela 3):

- Aumento significativo do consumo de etanol durante as fases posteriores à abstinência comparado com o da fase de livre escolha (animais 05, 14, 21, 27).
- Aumento significativo do consumo de etanol (g/kg) durante a adulteração comparado com o da fase de livre escolha (animais 04, 19, 40, 46, 55).
- Consumo de etanol (g/kg) significativamente maior durante as últimas duas semanas de livre escolha quando comparado com o das fases posteriores (animais 41, 44).
- Consumo de etanol sem alterações significativas durante o experimento (animais 45, 47, 51, 57, 58).

Para a determinação da preferência pelas soluções etílicas comparou-se a média do consumo de etanol com o consumo de água para cada animal durante a livre escolha, revelando os seguintes valores pelo teste “t” de Student: $t_4 = -10,36$, $t_5 = -26,28$, $t_{14} = -3,31$, $t_{19} = -20,17$, $t_{21} = -23,19$, $t_{27} = -5,26$, $t_{40} = -24,61$, $t_{41} = -21,02$, $t_{44} = -17,27$, $t_{45} = -18,53$, $t_{46} = -30,32$, $t_{47} = -22,71$, $t_{51} = -22,37$, $t_{55} = -8,91$, $t_{57} = -23,29$, $t_{58} = -15,68$, $p \leq 0,05$.

As Figuras 12 a 17 representam os padrões de consumo individual para os animais do grupo leve, com dos volumes das soluções consumidas (água, etanol 5% e etanol 10%) e o volume total de etanol (soma dos volumes das soluções etílicas).

TABELA 3 – PADRÃO INDIVIDUAL DE CONSUMO DE ETANOL DO GRUPO LEVE E PREFERÊNCIA ENTRE ETANOL E ÁGUA PARA CADA FASE EXPERIMENTAL.

Grupo	Animal	Livre escolha N [#] =14		Reapresentação N=14		Adulteração N=14		ANOVA consumo individual de etanol entre as fases	
		etanol (g/kg/dia)	Pref.	etanol (g/kg/dia)	Pref.	etanol (g/kg/dia)	Pref.	F(2, 40)	p ≤
NTX	14	3,5 ± 0,33	A	4,8 ± 0,31 ^a	A	5,6 ± 0,38 ^a	A	9,50	0,001
	19	2,9 ± 0,16	A	3,8 ± 0,20	A	3,7 ± 0,47 ^a	A	3,64	0,05
	40	2,1 ± 0,17	A	2,4 ± 0,13	A	2,6 ± 0,14 ^a	A	3,24	0,05
	44	3,8 ± 0,28	A	2,2 ± 0,27 ^a	A	1,9 ± 0,19 ^a	A	16,22	0,0001
	45	3,6 ± 0,27	A	2,9 ± 0,08	A	3,1 ± 0,24	A	2,33	0,15
	51	3,4 ± 0,20	A	3,2 ± 0,57	A	4,2 ± 0,41	A	1,40	0,30
	55	2,3 ± 0,10	A	2,6 ± 0,18	A	3,0 ± 0,20 ^a	A	4,69	0,05
	58	3,3 ± 0,28	A	3,5 ± 0,47	A	4,1 ± 0,49	A	1,16	0,40
Salina	4	4,5 ± 0,40	A	5,4 ± 0,54	A	6,9 ± 0,89 ^a	A	3,72	0,05
	5	2,7 ± 0,16	A	5,2 ± 0,46 ^a	A	4,9 ± 0,32 ^a	A	16,75	0,0001
	21	3,0 ± 0,14	A	5,3 ± 0,31 ^a	A	5,4 ± 0,59 ^a	A	12,69	0,0001
	27	4,2 ± 0,37	A	6,5 ± 0,45 ^a	A	6,6 ± 0,61 ^a	S	8,85	0,001
	41	3,0 ± 0,15	A	2,1 ± 0,20 ^a	A	2,3 ± 0,11 ^a	A	8,89	0,001
	46	2,2 ± 0,17	A	2,7 ± 0,23	A	3,2 ± 0,28 ^a	A	5,00	0,05
	47	3,2 ± 0,23	A	2,9 ± 0,36	A	3,7 ± 0,43	A	1,03	0,40
	57	2,7 ± 0,28	A	2,3 ± 0,31	A	2,8 ± 0,27	A	0,70	0,60

NOTA: O consumo de etanol está expresso como média ± erro padrão do consumo diário durante as semanas de cada fase (livre escolha: últimas 2 semanas antes da abstinência; reapresentação: 2 semanas após a abstinência; adulteração: 2 semanas seguintes à reapresentação).. A preferência está expressa como Pref.: A – preferência pela água, E – preferência pelo etanol, S – sem preferência. Na coluna da direita estão os valores de F para análise de variância (ANOVA) de uma via para o consumo individual de etanol e os respectivos valores de p. ^a diferente da fase de livre escolha; ^b diferente da fase de reapresentação; ^c diferente da fase de adulteração (p≤0,05 pelo menos, Newman-Keuls). # “N” representa o número de medidas diárias do consumo total de etanol para cada animal. NTX: animais do grupo leve que receberam naltrexona no experimento 3. Salina: animais do grupo leve que receberam salina no experimento 3.

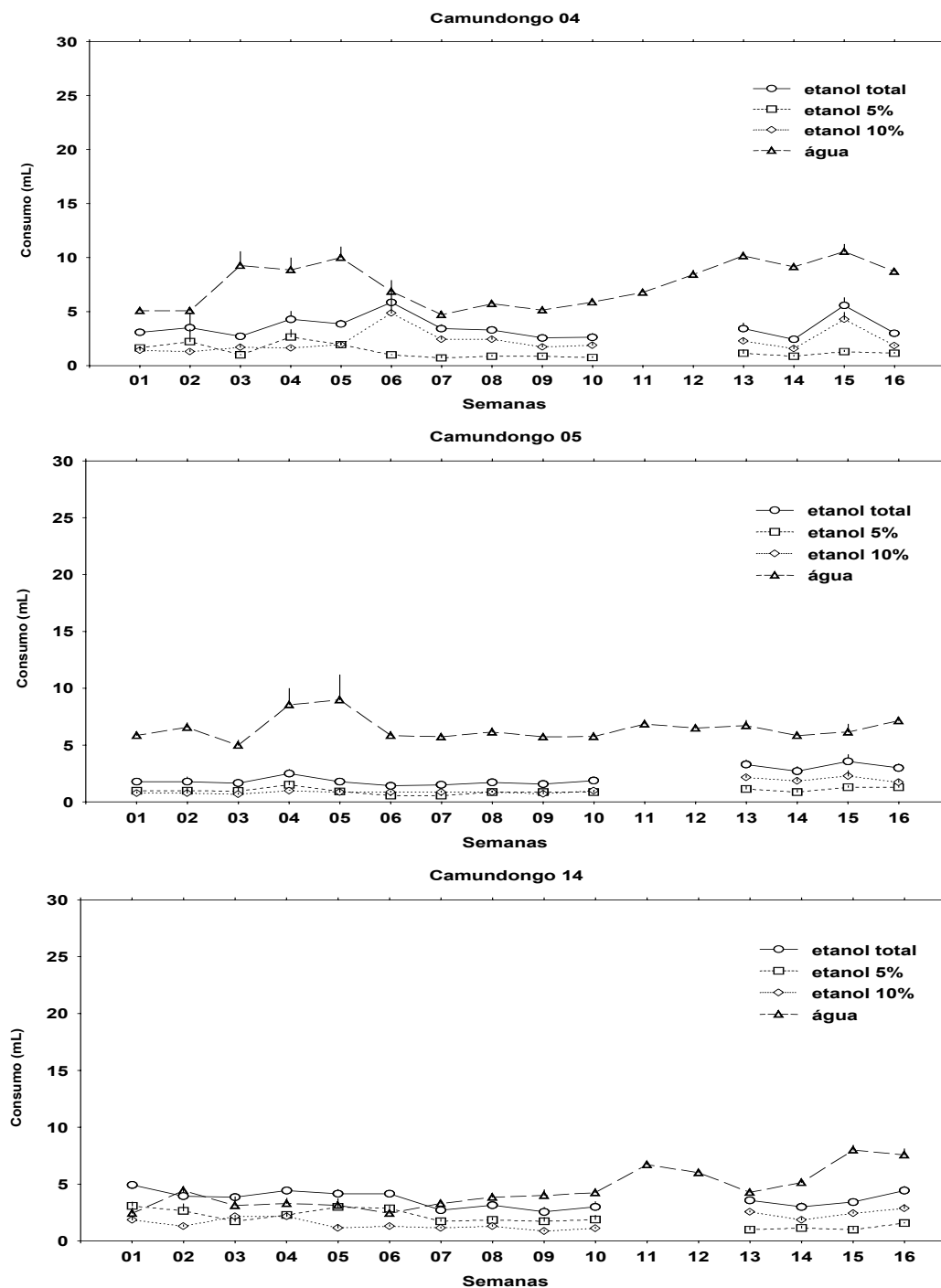


FIGURA 12 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 4, 5 E 14 DO GRUPO L: Consumo de etanol e água ao longo das fases expresso em média \pm erro padrão do consumo diário semanal (mL) (1-10: semanas da fase de livre escolha, 11-12: semanas da fase de abstinência, 13-14: semanas da fase de reapresentação, 15-16: semanas da fase de adulteração).

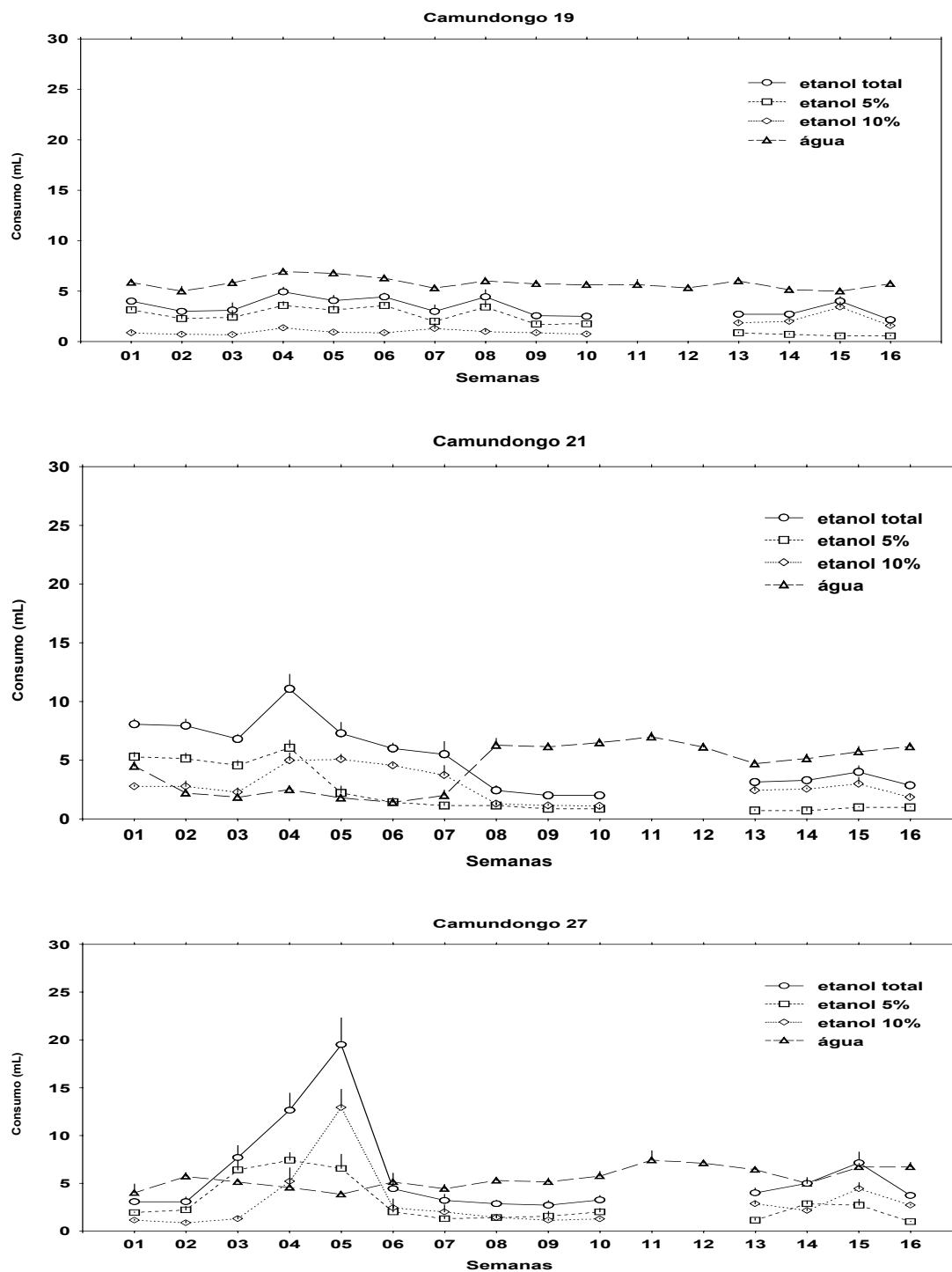


FIGURA 13 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 19, 21 E 27 DO GRUPO L: Consumo de etanol e água ao longo das fases expresso em média \pm erro padrão do consumo diário semanal (mL) (1-10: semanas da fase de livre escolha, 11-12: semanas da fase de abstinência, 13-14: semanas da fase de reapresentação, 15-16: semanas da fase de adulteração).

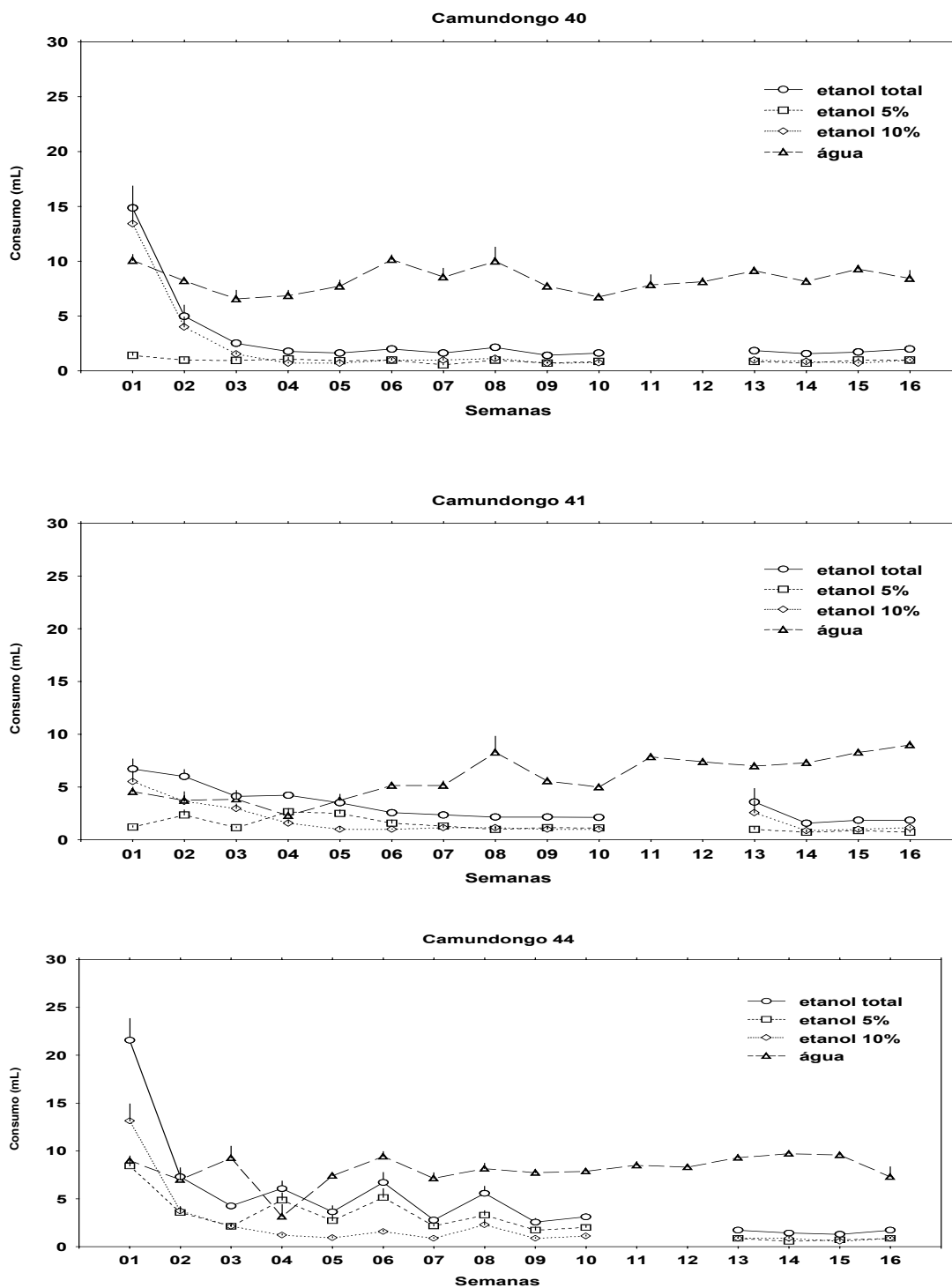


FIGURA 14 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 40, 41 E 44 DO GRUPO L: Consumo de etanol e água ao longo das fases expresso em média \pm erro padrão do consumo diário semanal (mL) (1-10: semanas da fase de livre escolha, 11-12: semanas da fase de abstinência, 13-14: semanas da fase de reapresentação, 15-16: semanas da fase de adulteração).

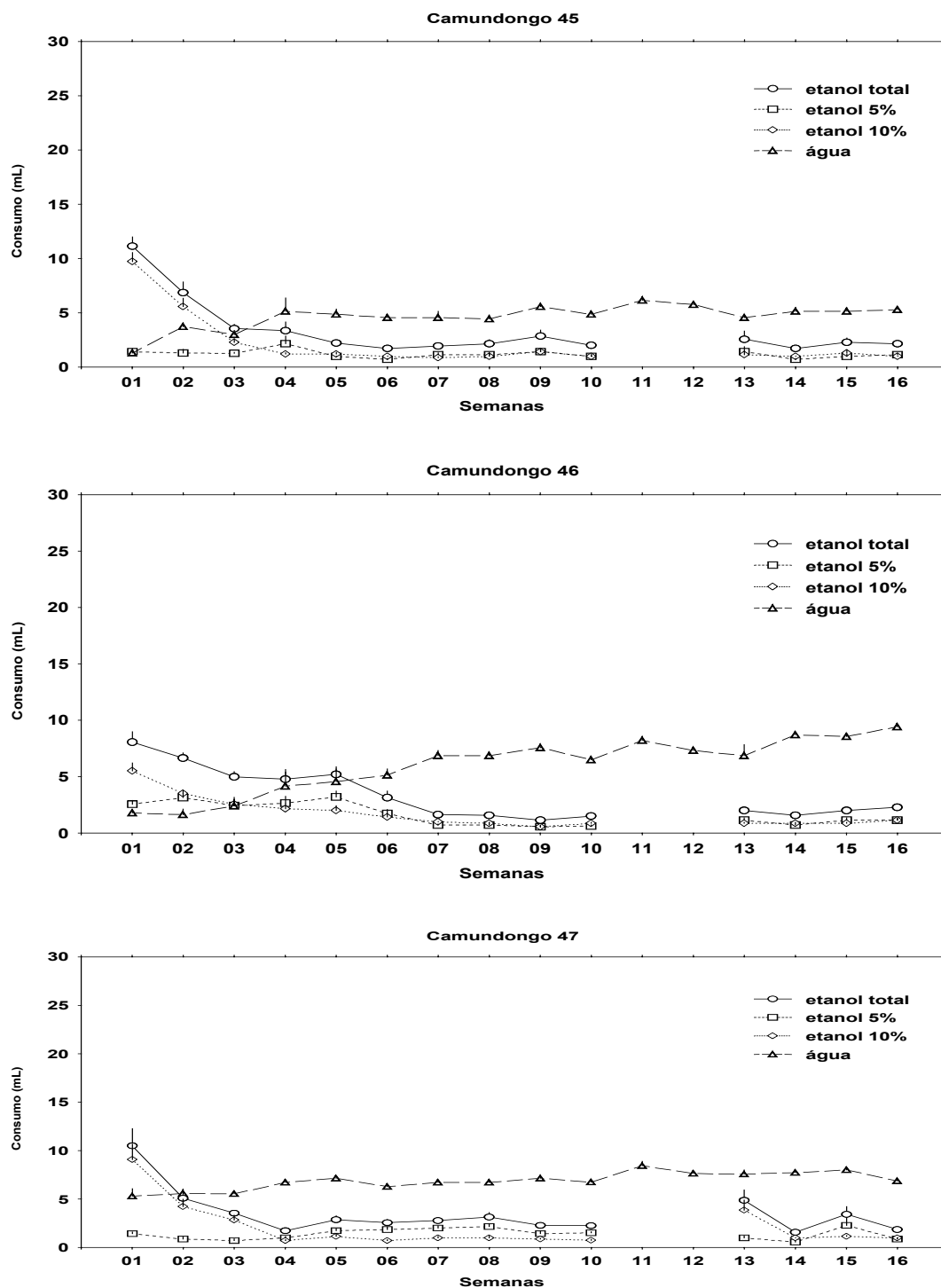


FIGURA 15 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 45, 46 E 47 DO GRUPO L: Consumo de etanol e água ao longo das fases expresso em média \pm erro padrão do consumo diário semanal (mL) (1-10: semanas da fase de livre escolha, 11-12: semanas da fase de abstinência, 13-14: semanas da fase de reapresentação, 15-16: semanas da fase de adulteração).

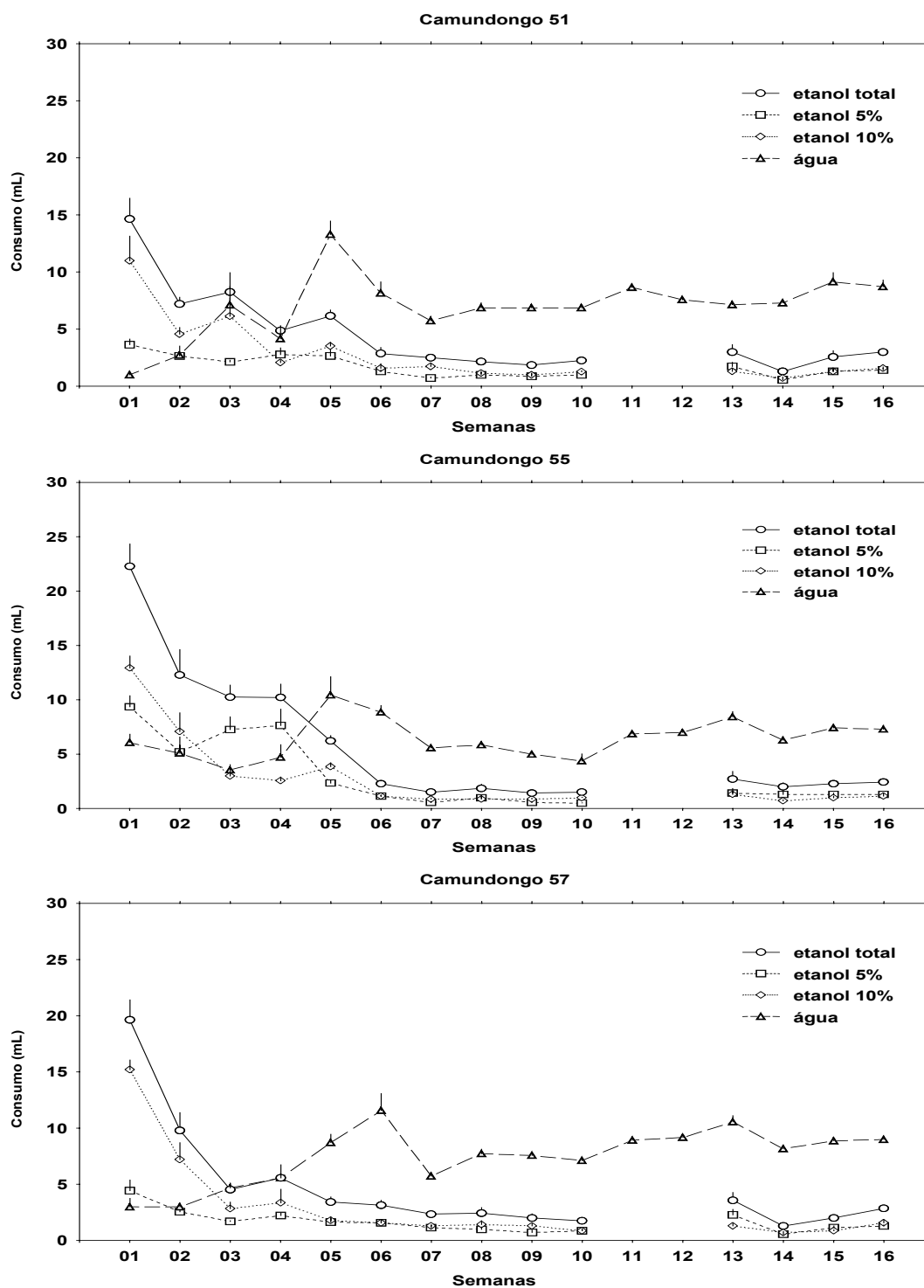


FIGURA 16 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 51, 55 E 57 DO GRUPO L: Consumo de etanol e água ao longo das fases expresso em média \pm erro padrão do consumo diário semanal (mL) (1-10: semanas da fase de livre escolha, 11-12: semanas da fase de abstinência, 13-14: semanas da fase de reapresentação, 15-16: semanas da fase de adulteração).

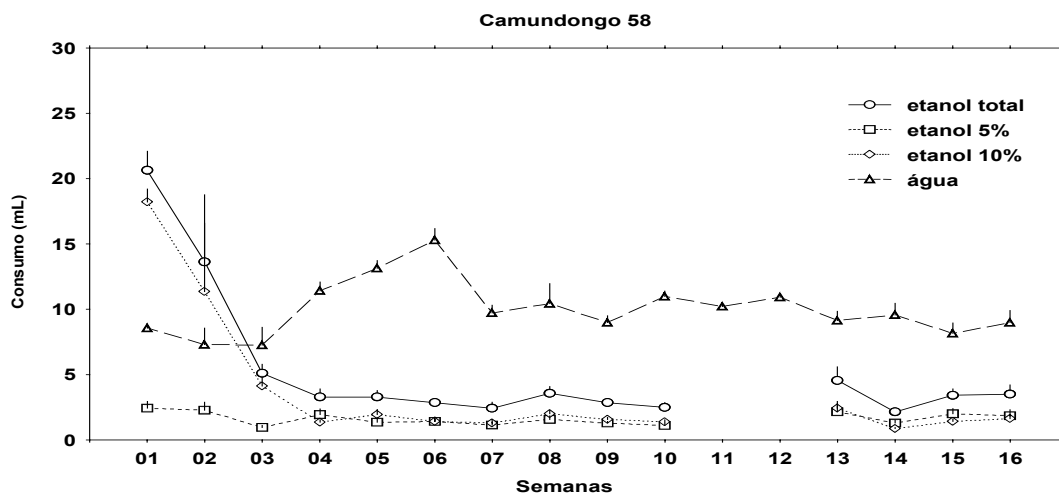


FIGURA 17 – CONSUMO PARA O ANIMAL 58 DO GRUPO L: Consumo de etanol e água ao longo das fases expresso em média \pm erro padrão do consumo diário semanal (mL) (1-10: semanas da fase de livre escolha, 11-12: semanas da fase de abstinência, 13-14: semanas da fase de reapresentação, 15-16: semanas da fase de adulteração).

Grupo Controle

Em geral, o consumo de água pelos animais do grupo controle se mostrou estável ao longo do experimento. Observou-se apenas um aumento do consumo nas semanas 6 e 8 ($F(15,135) = 4,19$, $p \leq 0,0001$). O padrão individual de consumo de água pelos animais do grupo controle está apresentado nas figuras 18 e 19.

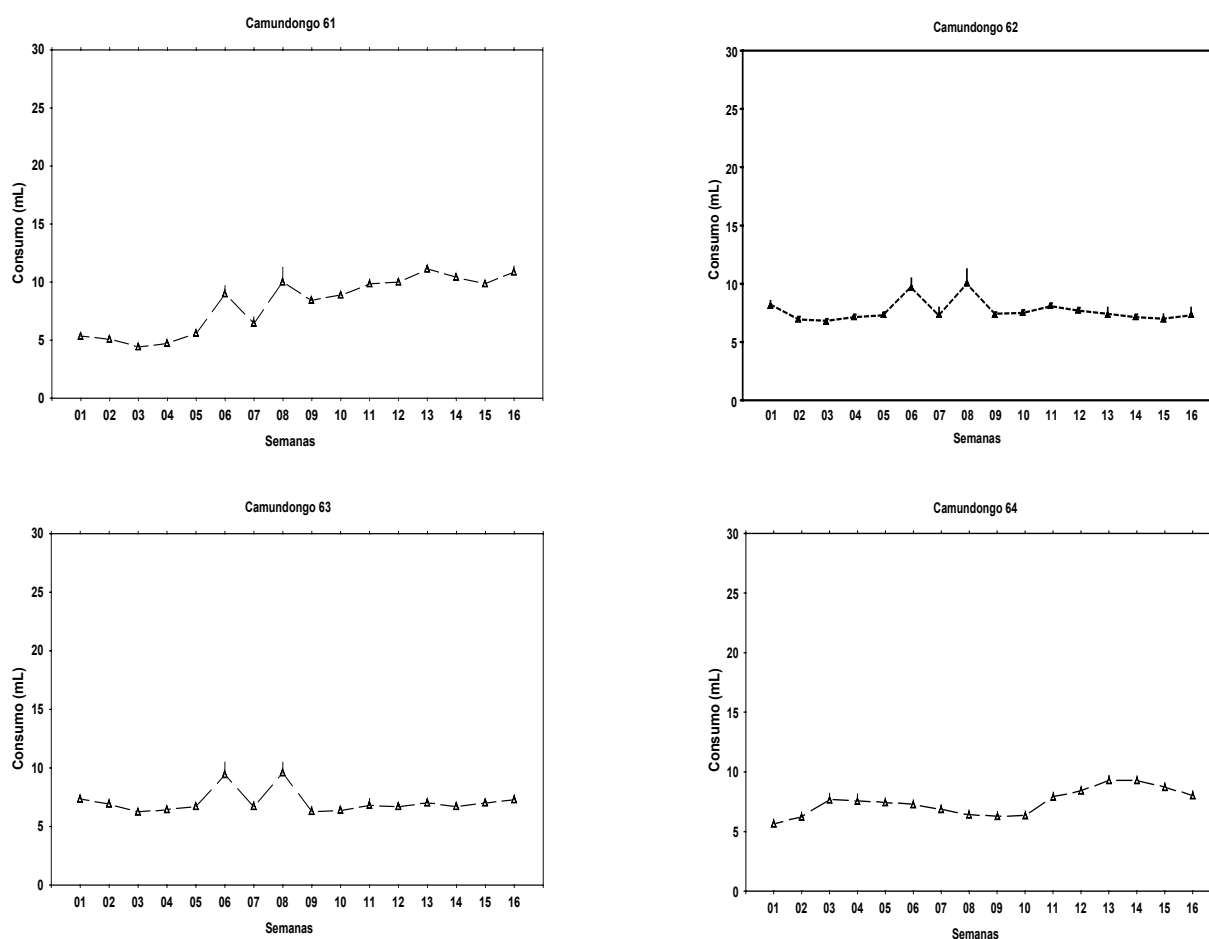


FIGURA 18 – CONSUMO DOS ANIMAIS 61, 62, 63 E 64 DO GRUPO CONTROLE: média \pm erro padrão do consumo diário semanal de água (mL) ao longo do experimento para os animais do grupo controle.

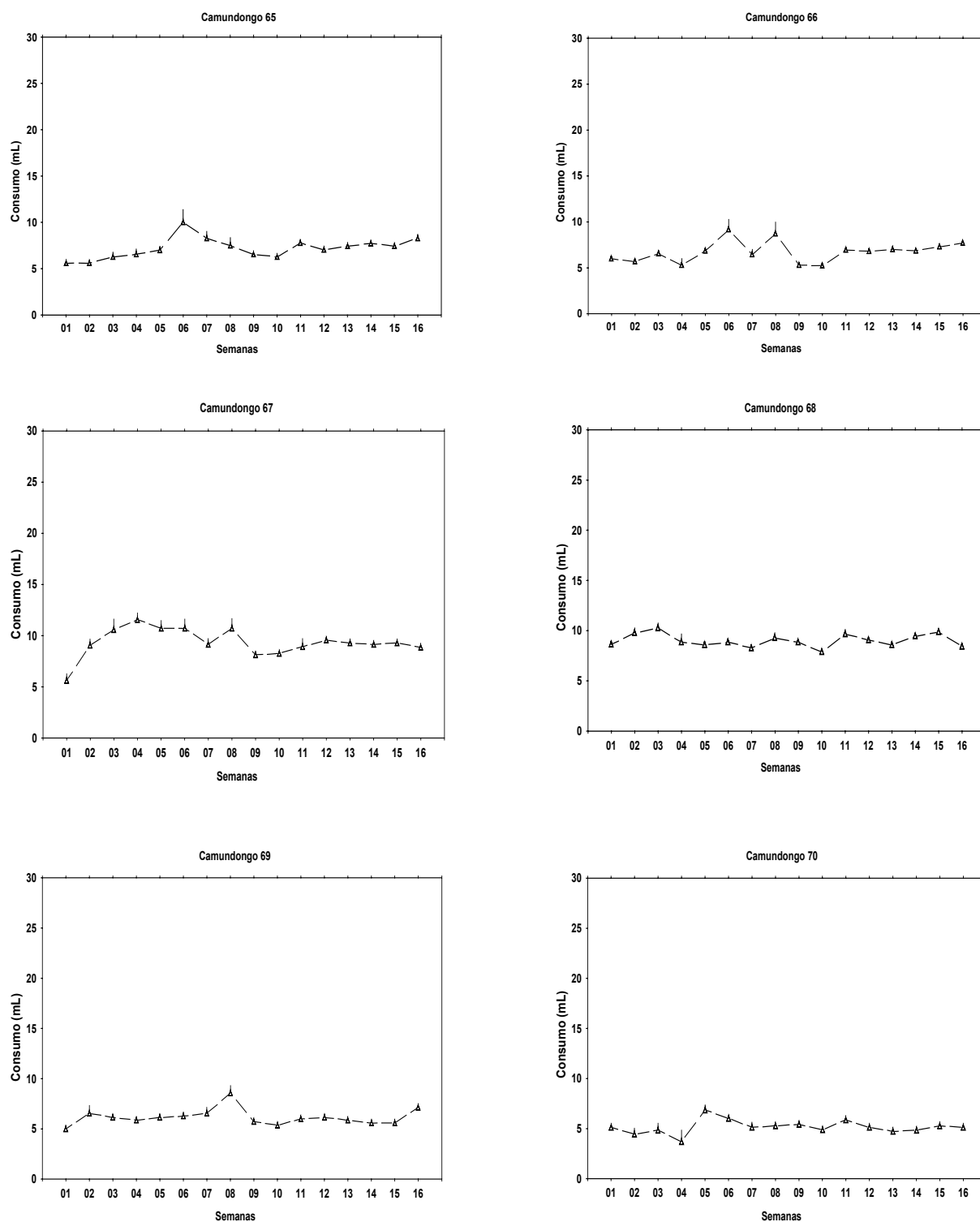


FIGURA 19 – CONSUMO DOS ANIMAIS 65, 66, 67, 68, 69 E 70 DO GRUPO CONTROLE: média \pm erro padrão do consumo diário semanal de água (mL) ao longo do experimento para os animais do grupo controle.

5.1.3 Padrão de Consumo nos Grupos

Etanol em gramas/kg

Em relação ao consumo de etanol em g/kg, o grupo leve apresentou um consumo significativamente menor do que o dos grupos dependente e pesado e, ainda, o grupo dependente apresentou consumo maior do que o pesado, sendo as médias diárias de consumo considerando as 2 últimas semanas da fase de livre escolha, as 2 semanas da fase de reapresentação e as 2 semanas da fase de adulteração: $12,1 \pm 0,94$ g/kg, $9,4 \pm 0,73$ g/kg e $3,8 \pm 0,30$ g/kg, para os grupos D, P e L, respectivamente ($F(2,42) = 37,87$, $p \leq 0,0001$, ANOVA de uma via seguida de teste de Newman-Keuls).

A comparação através da ANOVA de duas vias considerando os grupos D, P e L nas fases de LE, RE e AD revelou que para o fator grupo houve significância estatística ($F(2,42) = 37,87$, $p \leq 0,0001$), para o fator fase experimental também houve significância estatística ($F(5,210) = 9,87$, $p \leq 0,0001$) e ocorreu interação entre os fatores grupo e consumo de etanol (g/kg) nas fases experimentais ($F(10,210) = 10,15$, $p \leq 0,0001$).

Comparações entre as médias semanais de consumo diário de etanol (g/kg) a partir da nona semana do modelo revelaram que durante todo o experimento o grupo L consumiu significativamente menos do que os grupos D e P. Não houve diferença entre o consumo dos grupos D e P nas semanas 9, 10 e 13 e o grupo D consumiu mais do que o P nas semanas 14, 15 e 16, ou seja, na última semana de reapresentação e nas duas semanas da adulteração ($F_{9^a}(2,42) = 46,53$; $F_{10^a}(2,42) = 55,89$; $F_{13^a}(2,42) = 14,85$; $F_{14^a}(2,42) = 29,14$; $F_{15^a}(2,42) = 26,56$; $F_{16^a}(2,42) = 31,09$, $p \leq 0,0001$, ANOVA de uma via seguida de teste de Newman-Keuls), (figura 20).

O grupo D apresentou consumo de etanol (g/kg) na 15ª semana significativamente maior do que nas demais, com exceção da 13ª semana na qual diferiu do consumo na 9ª e 16ª semanas ($F(5,70) = 5,50$, $p \leq 0,0001$, ANOVA com medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls). No grupo P, o consumo de etanol (g/kg) mostrou redução significativa nas semanas da fase de reapresentação e de adulteração comparados com os das últimas duas semanas da fase de livre escolha ($F(5,65) = 16,23$, $p \leq 0,0001$, ANOVA com medidas repetidas seguida de teste

de Newman-Keuls). O grupo L apresentou um consumo de etanol (g/kg) na 13^a e 15^a semanas maior do que na 9^a, 10^a e 14^a semanas ($F(5,75)= 6,21$ $p\leq 0,0001$, ANOVA com medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls).

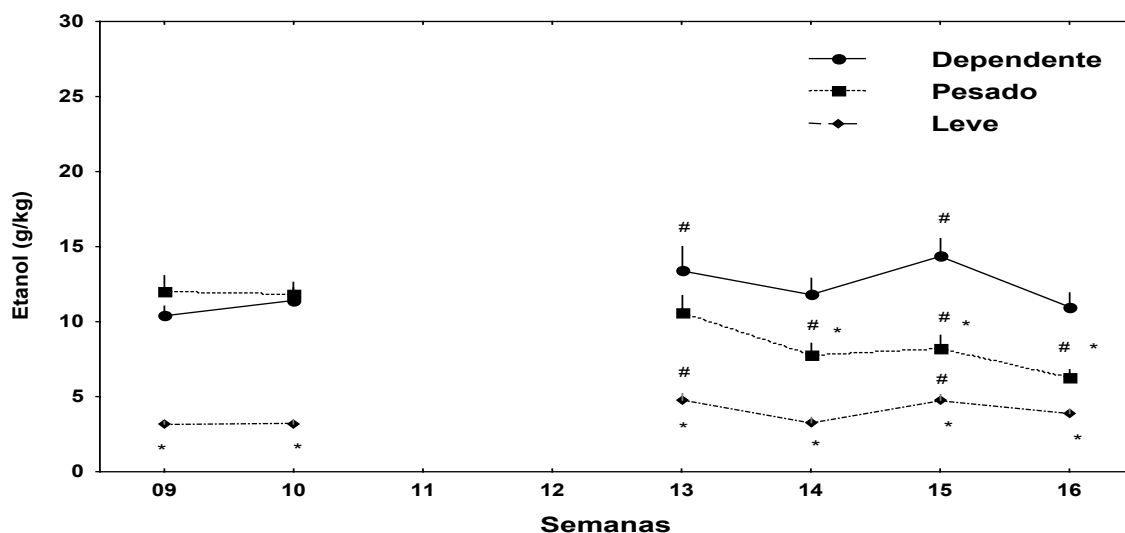


FIGURA 20 - CONSUMO DE ETANOL g/kg POR GRUPO: média \pm ep semanal do consumo diário para cada semana de tratamento (9-10: fase de livre escolha; 11-12: fase de abstinência; 13-14: fase de reapresentação; 15-16: fase de adulteração). *diferença entre os grupos na mesma semana ($p\leq 0,05$, ANOVA seguida de teste de Newman-Keuls). # diferença no grupo ao longo do tratamento ($p\leq 0,05$, ANOVA com medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls).

Etanol volume total

Considerando em conjunto as últimas 2 semanas de livre escolha, as 2 semanas de reapresentação e as 2 semanas de adulteração, o grupo leve apresentou um consumo de etanol médio total (ml) significativamente menor do que o dos grupos dependente e pesado e, ainda, o grupo dependente apresentou consumo maior do que o pesado. A média de consumo do grupo leve foi de $3 \pm 0,2$ ml comparado com $7 \pm 0,5$ ml e $6 \pm 0,3$ ml, do grupo dependente e pesado respectivamente ($F(2,42)= 43,49$ $p\leq 0,0001$, ANOVA de uma via seguida de teste de Newman-Keuls).

A comparação através da ANOVA de duas vias considerando os grupos D, P e L nas fases de LE, RE e AD revelou efeito significativo para o fator grupo ($F(2,42) = 43,49$, $p\leq 0,0001$) e para o fator fase experimental ($F(5,210) = 10,16$, $p\leq 0,0001$).

Também ocorreu interação entre os fatores grupo e consumo de etanol (mL) nas fases experimentais ($F(10,210) = 10,05$, $p \leq 0,0001$).

Comparações entre as médias semanais de consumo diário de etanol total (mL) a partir da nona semana do experimento revelaram que durante todo o tempo o grupo L consumiu significativamente menos do que os grupos D e P. O consumo não diferiu entre os grupos D e P nas semanas 9, 10 e 13, e o grupo D consumiu mais do que o P nas semanas 14, 15 e 16 ($F_{9^a}(2,42) = 63,80$; $F_{10^a}(2,42) = 63,62$; $F_{13^a}(2,42) = 14,01$; $F_{14^a}(2,42) = 25,11$; $F_{15^a}(2,42) = 26,56$; $F_{16^a}(2,42) = 26,80$, $p \leq 0,0001$, ANOVA de uma via seguida de teste de Newman-Keuls), (figura 21).

O grupo D apresentou um consumo de etanol total na primeira semana de adulteração significativamente maior do que na 9ª semana e na segunda semana de adulteração ($F(5,70) = 2,87$, $p \leq 0,05$, ANOVA com medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls). No grupo P, o consumo de etanol total mostrou redução significativa nas semanas da fase de reapresentação e de adulteração comparadas com as últimas duas semanas da fase de livre escolha ($F(5,65) = 18,80$, $p \leq 0,0001$, ANOVA com medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls). O grupo L apresentou um consumo de etanol (mL) quase sem alterações ao longo das semanas, exceto que o consumo na 13ª e 15ª semanas foi significativamente superior do que na 9ª, 10ª e 14ª semanas ($F(5,75) = 7,12$ $p \leq 0,0001$, ANOVA com medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls).

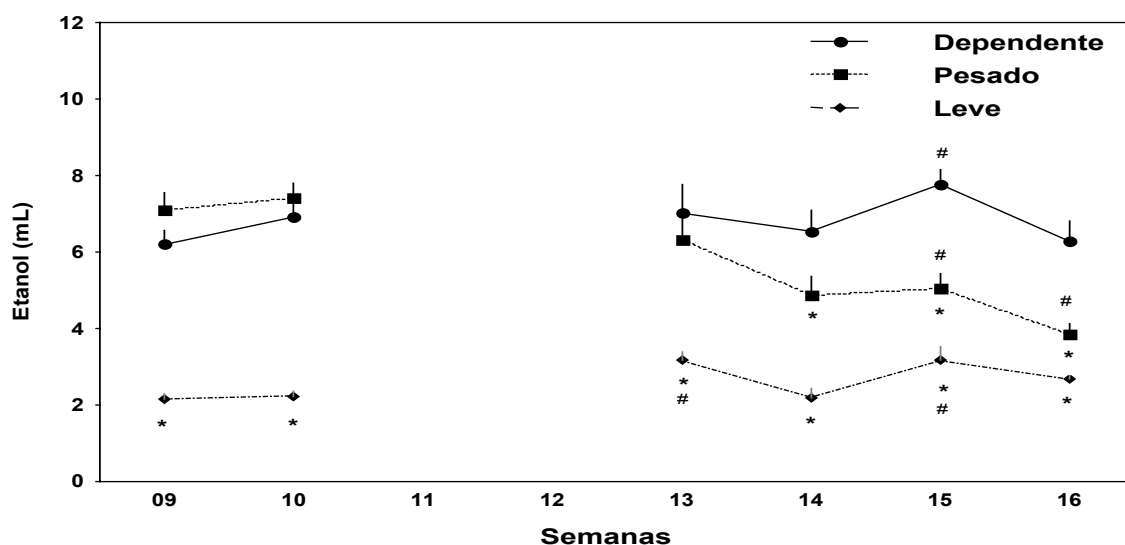


FIGURA 21 – CONSUMO DE ETANOL TOTAL (mL) POR GRUPO: média \pm ep semanal do consumo diário para cada semana de tratamento (9-10: fase de livre escolha; 11-12: fase de abstinência; 13-14: fase de reapresentação; 15-16: fase de adulteração). *diferença entre os grupos na mesma semana ($p \leq 0,05$, ANOVA seguida de teste de Newman-Keuls). # diferença no grupo ao longo do tratamento ($p \leq 0,05$, ANOVA para medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls).

Etanol 5%

Quanto ao consumo de etanol a 5%, o grupo L apresentou um consumo significativamente inferior ao dos demais grupos sendo a média desse consumo igual a $1 \pm 0,1$ mL, e a dos demais grupos igual a $3 \pm 0,3$ mL para os dois grupos ($F(2,42) = 12,78$, $p \leq 0,001$, ANOVA de uma via seguida de teste de Newman-Keuls).

A comparação através da ANOVA de duas vias considerando os grupos D, P e L e o consumo de etanol 5% nas fases de LE, RE e AD revelou efeito significativo para o fator grupo ($F(2,42) = 12,78$, $p \leq 0,0001$) e para o fator fase experimental ($F(5,210) = 12,80$, $p \leq 0,0001$). Também ocorreu interação entre estes fatores ($F(10,210) = 4,38$, $p \leq 0,0001$).

Comparações entre as médias semanais de consumo diário de etanol 5% a partir da nona semana de tratamento mostraram que o grupo L consumiu significativamente menos do que os grupos D e P nas semanas de livre escolha (9 e 10) e reapresentação (13 e 14). Nas semanas de adulteração, o grupo L consumiu menos do que o D e na 16ª semana o consumo do grupo pesado foi menor do que o D ($F_{9a}(2,42) = 10,97$, $p \leq 0,001$; $F_{10a}(2,42) = 11,41$, $p \leq 0,001$; $F_{13a}(2,42) = 5,95$, $p \leq 0,01$;

$F_{14^a}(2,42)= 5,76$, $p \leq 0,01$; $F_{15^a}(2,42)= 6,20$, $p \leq 0,01$; $F_{16^a}(2,42)= 10,50$, $p \leq 0,001$, ANOVA de uma via seguida de teste de Newman-Keuls), (figura 22).

O grupo D apresentou um consumo de etanol 5% na 10^a semana significativamente maior do que nas semanas 13-16. Na 9^a semana o consumo foi maior do que o da 13^a semana ($F(5,70)= 5,34$, $p \leq 0,001$, ANOVA com medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls). No grupo P, o consumo de etanol 5% mostrou redução significativa nas semanas da fase de reapresentação e de adulteração comparado com o das últimas duas semanas da fase de livre escolha ($F(5,65)= 9,00$, $p \leq 0,0001$, ANOVA com medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls). O grupo L apresentou consumo de etanol 5% sem alterações ao longo das semanas ($F(5,75)= 1,34$ $p > 0,05$, ANOVA com medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls).

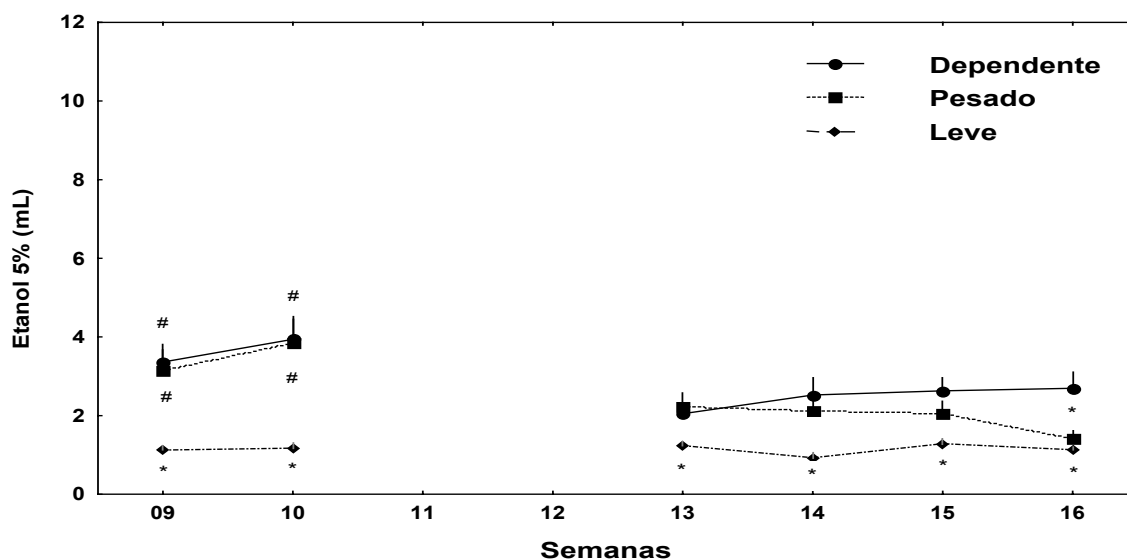


FIGURA 22 - CONSUMO DE ETANOL 5% POR GRUPO: média \pm ep semanal do consumo diário para cada semana de tratamento (9-10: fase de livre escolha; 11-12: fase de abstinência; 13-14: fase de reapresentação; 15-16: fase de adulteração). *diferença entre os grupos na mesma semana ($p \leq 0,05$, ANOVA seguida de Newman-Keuls). # diferença no grupo ao longo do experimento ($p \leq 0,05$, ANOVA com repetição seguida de Newman-Keuls).

Etanol 10%

Quanto ao consumo de etanol 10% (mL), o grupo L apresentou um consumo significativamente inferior ao dos demais grupos ($F(2,42)= 18,30$, $p\leq 0,001$, ANOVA de uma via seguida de teste de Newman-Keuls). O valor da média de consumo foi de $4 \pm 0,4$ mL, $3 \pm 0,3$ mL e $1 \pm 0,1$ mL para o grupo D, P e L, respectivamente.

A comparação através da ANOVA de duas vias considerando os grupos D, P e L e o consumo de etanol 10% nas fases de LE, RE e AD revelou efeito significativo para o fator grupo ($F(2,42) = 18,30$, $p\leq 0,0001$), para o fator fase experimental ($F(5,210) = 10,36$, $p\leq 0,0001$) e houve interação entre estes ($F(10,210)= 6,10$, $p\leq 0,0001$).

Comparações entre as médias semanais de consumo diário de etanol 10% a partir da nona semana de tratamento mostraram que o grupo L consumiu significativamente menos do que os grupos D e P em todas as semanas, exceto na 15ª semana quando consumiu menos do que o D somente. Nas semanas 14-16 o grupo P consumiu significativamente menos do que o D e na 9ª semana, o grupo P consumiu mais do que o grupo D ($F_{9ª}(2,42)= 18,73$, $p\leq 0,0001$; $F_{10ª}(2,42)= 14,86$, $p\leq 0,0001$; $F_{13ª}(2,42)= 9,75$, $p\leq 0,001$; $F_{14ª}(2,42)= 12,96$, $p\leq 0,0001$; $F_{15ª}(2,42)= 15,95$, $p\leq 0,0001$; $F_{16ª}(2,42)= 14,14$, $p\leq 0,0001$, ANOVA de uma via seguida de teste de Newman-Keuls), (figura 23).

O grupo D apresentou um consumo de etanol 10% na 13ª e 15ª semanas significativamente maior do que nas demais semanas. Na 14ª semana o consumo foi maior do que o da 9ª semana ($F(5,70)= 9,70$, $p\leq 0,0001$, ANOVA com medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls). No grupo P, o consumo de etanol 10% mostrou redução significativa na 14ª e 16ª semanas comparado ao da fase de livre escolha e na 16ª semana foi menor do que o da 13ª ($F(5,65)= 4,85$, $p\leq 0,001$, ANOVA com medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls). No grupo L o consumo de etanol 10% nas semanas 13 e 15 foi significativamente superior ao da 9ª, 10ª e 14ª semanas ($F(5,75)= 7,01$ $p\leq 0,0001$, ANOVA com medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls).

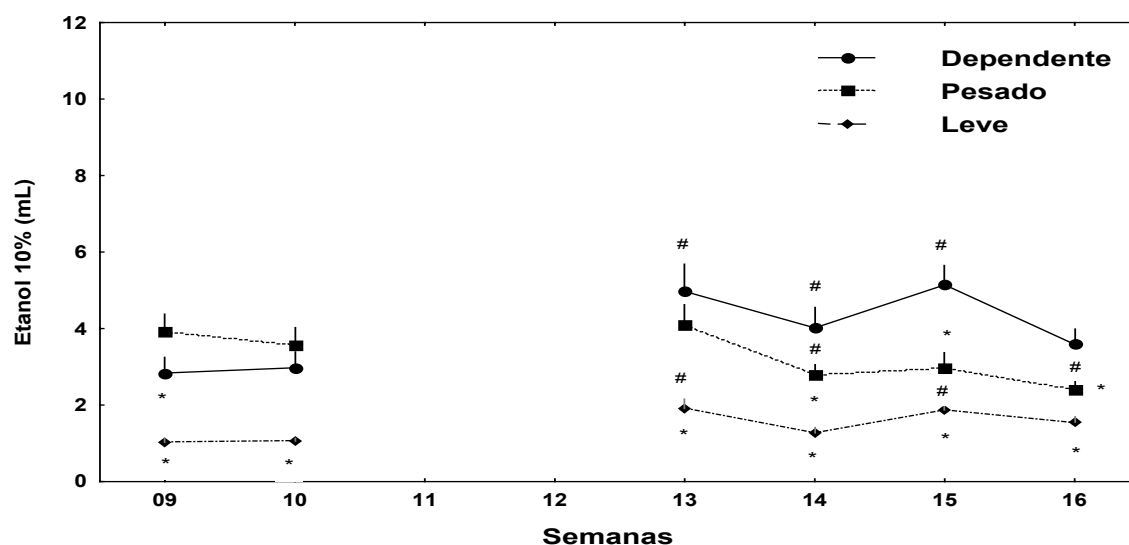


FIGURA 23 - CONSUMO DE ETANOL 10% POR GRUPO: média \pm ep semanal do consumo diário para cada semana do modelo (9-10: fase de livre escolha; 11-12: fase de abstinência; 13-14: fase de reapresentação; 15-16: fase de adulteração). *diferença entre os grupos na mesma semana ($p \leq 0,05$, ANOVA seguido de Newman-Keuls). # diferença no grupo ao longo do experimento ($p \leq 0,05$, ANOVA de 1 via com repetição seguido de Newman-Keuls).

Água

Quanto à água (mL), o grupo controle e o grupo L apresentaram os maiores consumos ($7 \pm 0,5$ mL e $7 \pm 0,3$ mL, respectivamente) e que foram significativamente superiores ao consumo dos grupos dependente e pesado ($4 \pm 0,3$ mL e $5 \pm 0,3$ mL, respectivamente); o consumo do grupo P foi significativamente superior ao do grupo D. ($F(3,51) = 26,39$, $p \leq 0,0001$, ANOVA de uma via seguida de teste de Newman-Keuls).

A comparação através da ANOVA de duas vias considerando os grupos D, P e L e o consumo de água nas fases de LE, RE e AD revelou efeito significativo para o fator grupo ($F(3,51) = 26,39$, $p \leq 0,0001$) e para o fator fase experimental ($F(7,357) = 79,82$, $p \leq 0,0001$). Também ocorreu interação entre estes fatores ($F(21,357) = 16,41$, $p \leq 0,0001$).

Comparações entre as médias semanais de consumo diário de água a partir da nona semana de tratamento mostraram que o grupo L e controle consumiram significativamente mais do que os grupos D e P em todas as semanas, exceto na 15ª e 16ª semanas quando consumiram mais do que o D somente. O consumo do grupo P não diferiu do D, exceto na 14ª, 15ª e 16ª semanas quando o consumo foi

maior no grupo P. O consumo do grupo L não diferiu do controle em nenhuma semana. Na 11^a e 12^a semanas (abstinência) não houve diferença significativa no consumo de água entre os grupos. Na 13^a semana todos os grupos retornaram praticamente ao mesmo padrão de consumo das semanas anteriores à abstinência ($F_{9a}(3,51)= 56,25$, $p \leq 0,0001$; $F_{10a}(3,51)= 67,90$, $p \leq 0,0001$; $F_{11a}(3,51)= 1,27$, $p > 0,05$; $F_{12a}(3,51)= 0,84$, $p > 0,05$; $F_{13a}(3,51)= 25,69$, $p \leq 0,0001$; $F_{14a}(3,51)= 36,40$, $p \leq 0,0001$; $F_{15a}(3,51)= 14,89$, $p \leq 0,0001$; $F_{16a}(3,51)= 14,44$, $p \leq 0,0001$, ANOVA de uma via seguida de teste de Newman-Keuls), (figura 24).

Para o consumo de água foi observado que, tanto no grupo D como no grupo P, nas duas semanas de abstinência, o consumo de água foi significativamente maior em comparação com as demais semanas ($F(7,98)= 42,11$, $p \leq 0,0001$; $F(7,91)= 50,28$, $p \leq 0,0001$, respectivamente). Nos grupos L e controle o consumo na nona e décima semanas foi significativamente menor do que nas semanas subsequentes ($F(7,105)= 6,50$, $p \leq 0,0001$; $F(7,63)= 7,22$, $p \leq 0,0001$, respectivamente).

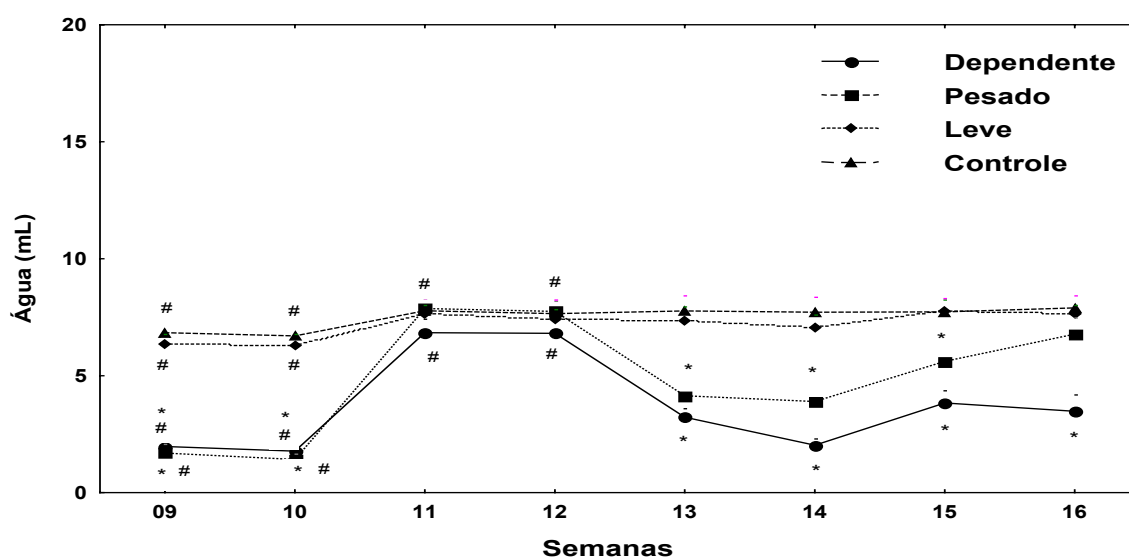


FIGURA 24 - CONSUMO DE ÁGUA POR GRUPO: média \pm ep semanal do consumo diário para cada semana do modelo (9-10: fase de livre escolha; 11-12: fase de abstinência; 13-14: fase de reapresentação; 15-16: fase de adulteração). *diferença entre os grupos na mesma semana ($p \leq 0,05$, ANOVA seguida de Newman-Keuls). # diferença no grupo ao longo do experimento ($p \leq 0,05$, ANOVA com repetição seguida de Newman-Keuls).

Preferência entre etanol e água

Quando se considera o consumo médio diário da 9ª semana em diante, nota-se que o grupo D demonstrou consumo de etanol (mL) significativamente maior do que os grupos P e L, sendo que o consumo de etanol do grupo P foi maior do que do grupo L ($F(2,42)= 43,49$, $p\leq 0,0001$). O grupo L consumiu significativamente mais água (mL) do que os demais grupos e o grupo P consumiu mais água do que o D ($F(2,42)= 45,97$, $p\leq 0,0001$). Comparações feitas dentro do mesmo grupo revelaram que o consumo de etanol (mL) para os grupos D e P foi significativamente maior do que o de água ($t= 7,23$, $p\leq 0,0001$; $t= 3,73$, $p\leq 0,001$, respectivamente). Já no grupo L, o consumo de etanol (mL) foi significativamente menor do que o de água ($t= -12,07$, $p\leq 0,0001$), (figura 25).

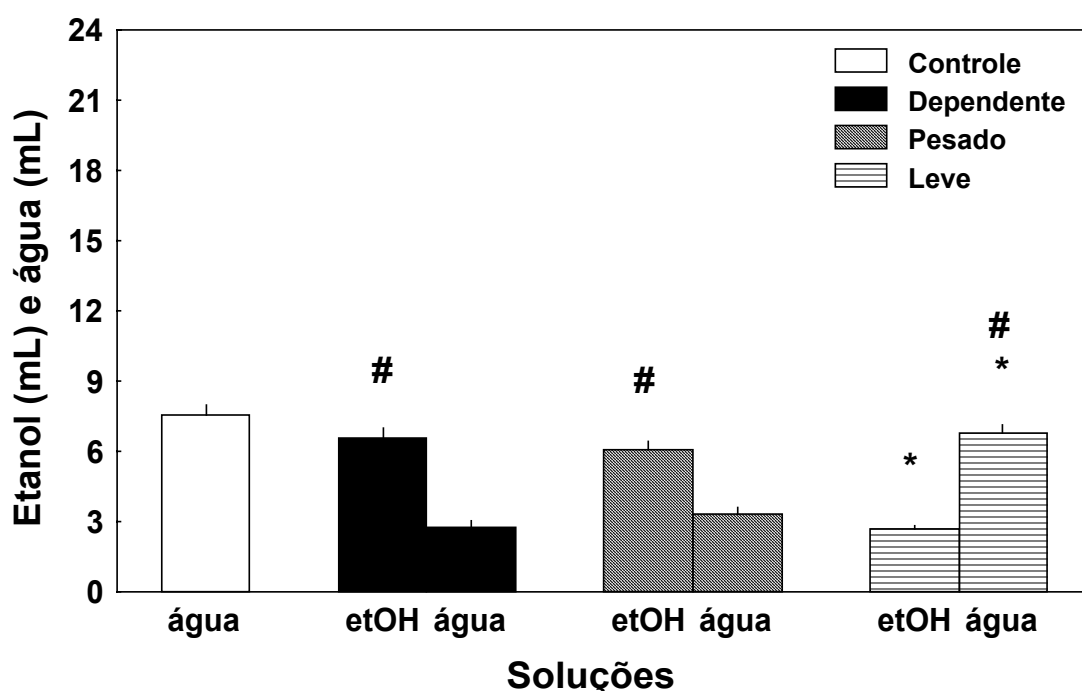


FIGURA 25 – PREFERÊNCIA ENTRE ÁGUA E ETANOL POR GRUPO: média \pm ep do consumo diário considerando todas as semanas a partir da nona semana do modelo. *diferença entre os grupos ($p\leq 0,05$, ANOVA seguida de teste de Newman-Keuls). #diferença entre o consumo de água e etanol no mesmo grupo ($p\leq 0,05$, teste t independente).

Outra forma de representar a preferência é através da porcentagem de etanol consumido. A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo para o fator grupo ($F(2,42) = 88,88$, $p \leq 0,0001$), para o fator fase experimental ($F(2,84) = 57,88$, $p \leq 0,0001$) e interação entre esses fatores ($F(4,84) = 29,70$, $p \leq 0,0001$). Na Figura 26, pode-se observar que os grupos D e P consumiram mais etanol do que o grupo L em todas as fases: LE ($F(2,42) = 151,47$, $p \leq 0,0001$), RE ($F(2,42) = 55,33$, $p \leq 0,0001$), AD ($F(2,42) = 38,24$, $p \leq 0,0001$). Nas fases RE e AD o grupo P apresentou consumo de etanol significativamente inferior ao grupo D. A comparação entre as fases mostrou que o grupo D reduziu significativamente a preferência pelo etanol nas fases RE e AD, porém mantendo a preferência pelo etanol em relação à água ($F_D(2,28) = 10,41$, $p \leq 0,001$, seguida de Newmann Keuls). O grupo P reduziu a sua preferência pelo etanol nas fases RE e AD, sendo que nessa última fase a preferência pelo etanol desapareceu ($F_P(2,26) = 55,62$, $p \leq 0,0001$, seguida de Newmann Keuls). Para o grupo L não ocorreu diferença significativa entre as fases ($F_L(2,30) = 0,56$, $p > 0,05$, seguida de Newmann Keuls), sendo sua preferência sempre pela água.

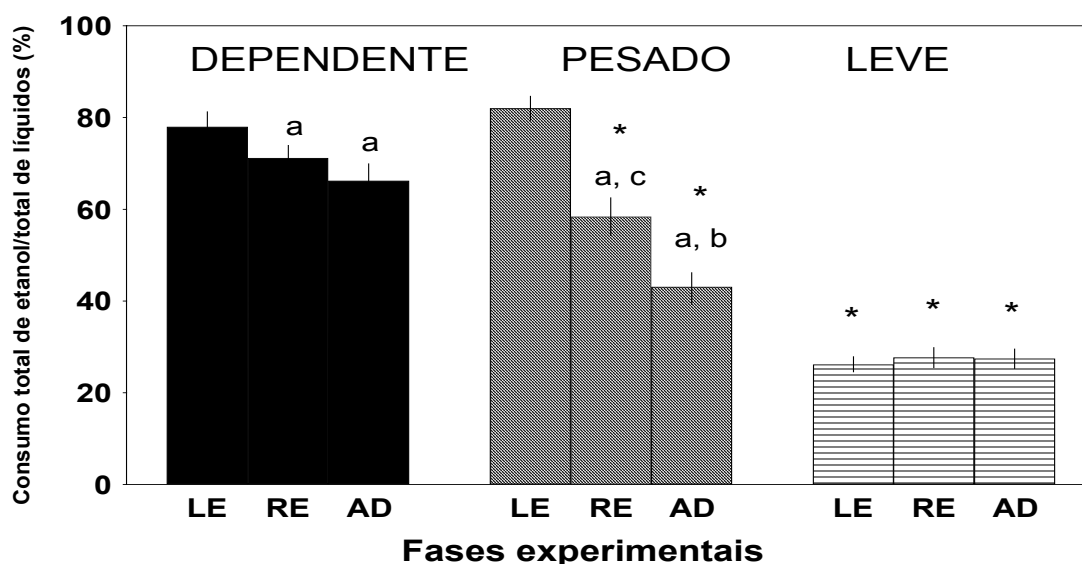


FIGURA 26 – PREFERÊNCIA ENTRE ÁGUA E ETANOL POR GRUPO E POR FASE: Consumo de etanol durante cada fase experimental (LE = 2 últimas semanas da fase de livre escolha; RE = 2 semanas da fase de reapresentação; AD = 2 semanas da fase de adulteração) apresentado pelos grupos D, P e L. Os dados estão expressos como média \pm ep da porcentagem do total de volume de etanol em relação ao total de líquidos ingeridos. Os símbolos representam diferenças significantes: * dos outros grupos na mesma fase; ^a da fase LE; ^b da fase RE; ^c da fase AD, no mesmo grupo ($p \leq 0,05$, ANOVA seguida por teste de Newman-Keuls).

A ANOVA de duas vias para o consumo de etanol em gramas/quilograma revelou efeito significativo para o fator grupo ($F(2,42) = 37,87$, $p \leq 0,0001$), efeito não significativo para o fator fase experimental ($F(2,84) = 1,73$, $p > 0,05$) e interação significativa entre esses fatores ($F(4,84) = 16,57$, $p \leq 0,0001$). Na Figura 27 (A) pode-se observar que o grupo D apresentou consumo de etanol maior que o grupo L nas 3 fases e maior que o grupo P nas fases RE e AD (LE: $F(2,42) = 53,09$, $p \leq 0,0001$; RE: $F(2,42) = 23,64$, $p \leq 0,0001$; AD: $F(2,42) = 32,33$, $p \leq 0,0001$, seguida de Newmann Keuls). O seu consumo foi estável ao longo das fases ($F_D(2,28) = 3,33$, $p > 0,05$). O grupo P, que também tinha consumo alto e igual ao grupo D na fase LE, reduziu significativamente o seu consumo nas fases RE e AD ($F_P(2,26) = 23,04$, $p \leq 0,0001$), porém seu consumo se mostrou superior ao do grupo L em todas as fases. O grupo L aumentou significativamente seu consumo nas fases RE e AD em relação ao da fase LE ($F_L(2,30) = 6,05$, $p \leq 0,01$).

A ANOVA de duas vias realizada para o consumo de água detectou efeito significativo para o fator grupo ($F(3,50) = 34,69$, $p \leq 0,0001$), para o fator fase experimental ($F(3,150) = 106,42$, $p \leq 0,0001$) e interação entre os fatores ($F(9,150) = 21,47$, $p \leq 0,0001$). Na Figura 27 (B) nota-se que o grupo L consumiu significativamente mais água do que os outros grupos em todas as fases, exceto na abstinência, quando todos os grupos igualaram os seus consumos de água (LE: $F(3,51) = 69,45$, $p \leq 0,0001$; AB: $F(3,51) = 1,06$, $p > 0,05$; RE: $F(3,51) = 33,48$, $p \leq 0,0001$ e AD: $F(3,51) = 16,03$, $p \leq 0,0001$). As diferenças entre os grupos observadas nas fases LE, RE e AD refletem o maior consumo de etanol pelos grupos D e P. ($F_D(3,42) = 54,29$; $F_P(3,39) = 59,77$; $F_L(3,45) = 8,89$; $F_C(3,27) = 10,48$, $p \leq 0,0001$).

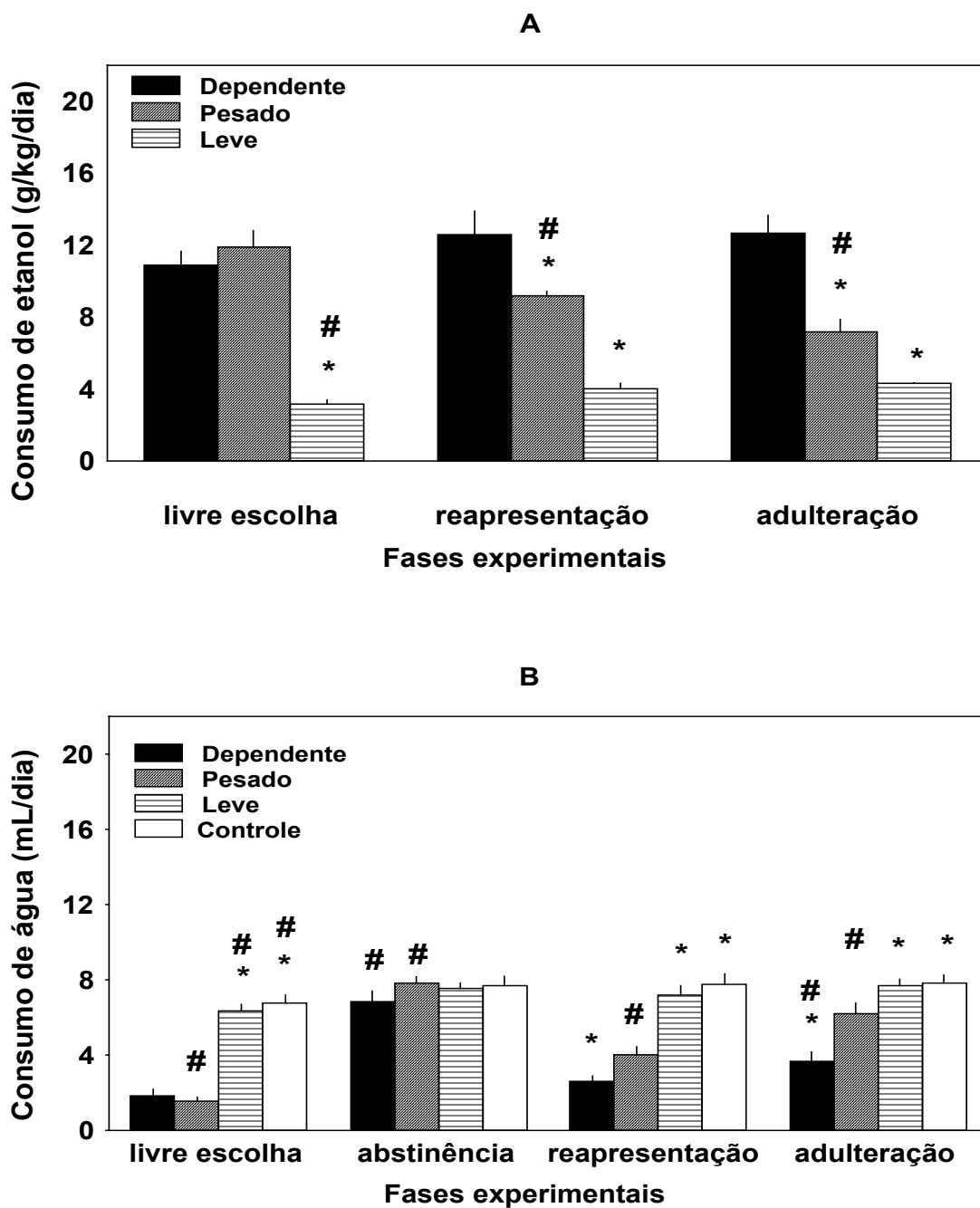


FIGURA 27 – CONSUMO DE ETANOL E ÁGUA: A: Consumo de etanol (g/kg/dia) pelos grupos dependente, pesado e leve nas fases de livre escolha (2 últimas semanas), de reapresentação e de adulteração. B: Consumo de água (mL/dia) pelos grupos dependente, pesado, leve e controle nas fases de livre escolha (2 últimas semanas), de abstinência, de reapresentação e de adulteração. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. Os símbolos representam diferenças significantes: * dos outros grupos na mesma fase ($p \leq 0,05$, ANOVA seguida por teste de Newman-Keuls); # das outras fases no mesmo grupo ($p \leq 0,05$, ANOVA para medidas repetidas seguida por teste de Newman-Keuls).

5.2. EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

5.2.1 Avaliação comportamental basal antes da exposição ao modelo de livre escolha

Os valores das variáveis comportamentais observadas durante os testes basal e na abstinência (procedimentos descritos no item 4.3.1) para cada grupo se encontram nas Tabelas 1 a 6 no apêndice 3.

5.2.2 Avaliação comportamental na abstinência

Quando comparadas as medidas realizadas na avaliação basal com as observadas durante a abstinência, para cada um dos grupos, foram encontradas algumas diferenças significativas.

No campo aberto, observou-se uma diminuição significativa da ambulação nos grupos D e P (figura 28 – parte superior). A ANOVA de duas vias revelou efeito não significativo para o fator grupo ($F(3,51) = 0,57$, $p > 0,05$) e efeito significativo para o fator ocasião ($F(1,51) = 15,56$, $p \leq 0,001$) e interação significativa entre esses fatores ($F(3,51) = 3,45$, $p \leq 0,05$). Comparações entre os grupos demonstraram que o número de ambulações apresentado pelos grupos D e P foi significativamente menor do que o do grupo controle, no teste realizado na abstinência. Todos os grupos apresentaram uma redução significativa no número de elevações e aumento significativo no tempo de latência. O grupo P apresentou maior número de posições esticadas na área central do campo aberto em relação aos grupos D e controle. Os grupos D, P e L apresentaram um número significativamente menor de posições esticadas na periferia do campo aberto em relação ao grupo controle (tabelas 3 e 4 do apêndice 3).

No labirinto em cruz elevado, ocorreu redução significativa no número de entradas e no tempo de permanência no braço aberto para todos os grupos. Observou-se também aumento significativo no tempo de permanência no braço fechado para todos os grupos. Os grupos D e P demonstraram aumento significativo no tempo de permanência na área central do labirinto e para o grupo L houve aumento, mas não alcançou significância estatística (tabelas 1 e 2 do apêndice 3; figura 28 – parte inferior).

Na caixa de movimentação espontânea, observou-se redução significativa nos parâmetros ambulação e número de elevações para o grupo D após a comparação entre teste basal e na abstinência. Comparações entre os grupos demonstraram que o número de ambulações no grupo D foi significativamente menor do que nos grupos P, L e controle, no teste realizado na abstinência (tabelas 5 e 6 do apêndice 3; figura 29).

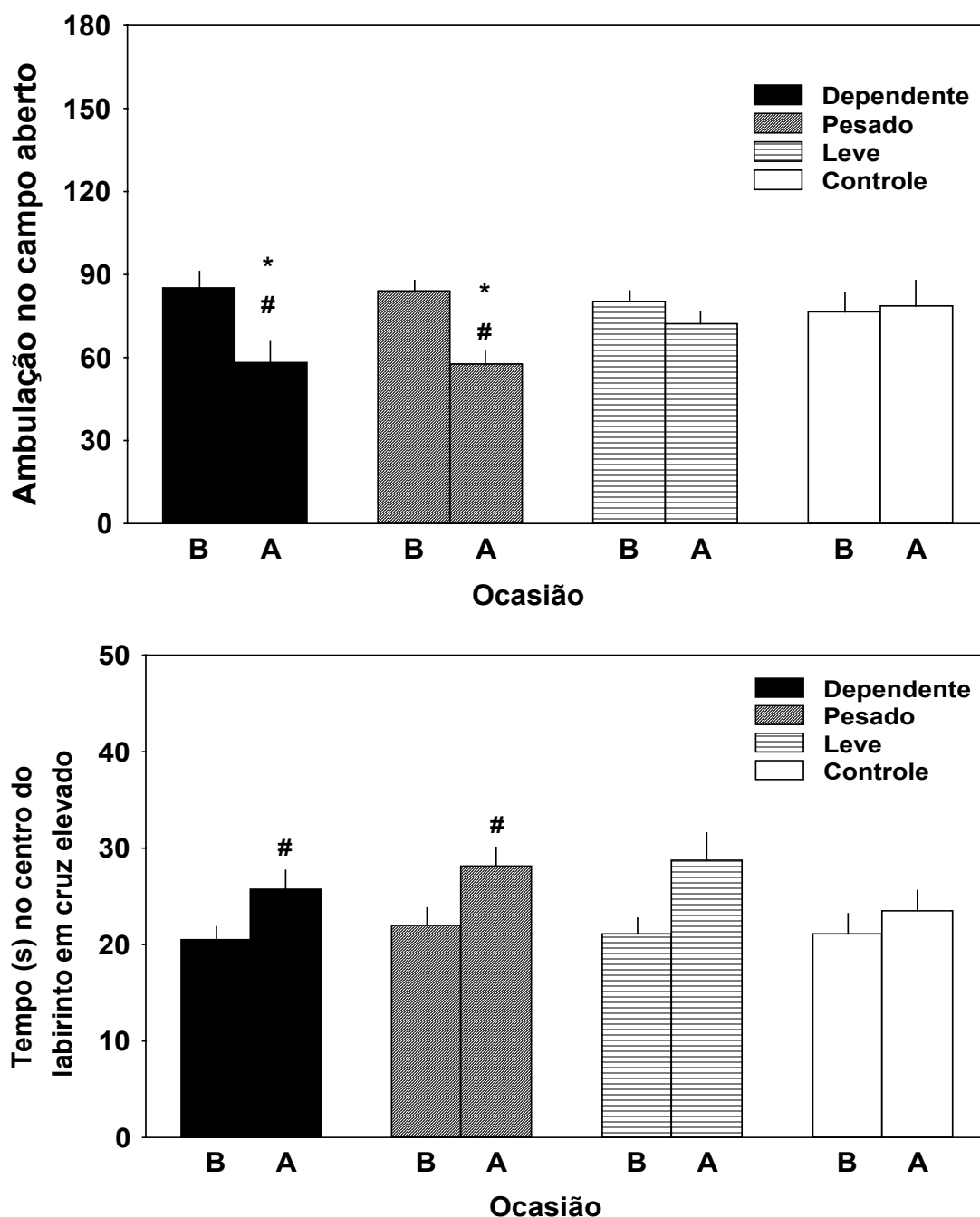


FIGURA 28 – AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL BASAL (B) E NA FASE DE ABSTINÊNCIA (A): Ambulação no campo aberto (parte superior) e tempo de permanência na área central do labirinto em cruz elevado (parte inferior) avaliados nos testes realizados antes da exposição ao paradigma de livre escolha (B) e após 5 h da retirada das soluções de etanol na fase de abstinência (A) para todos os grupos. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. Os símbolos representam diferenças significantes: # entre as ocasiões no mesmo grupo ($p < 0,05$, teste “t” de Student para amostras dependentes); * de outros grupos na mesma ocasião ($p \leq 0,05$, pelo menos, ANOVA seguida por teste de Newman-Keuls).

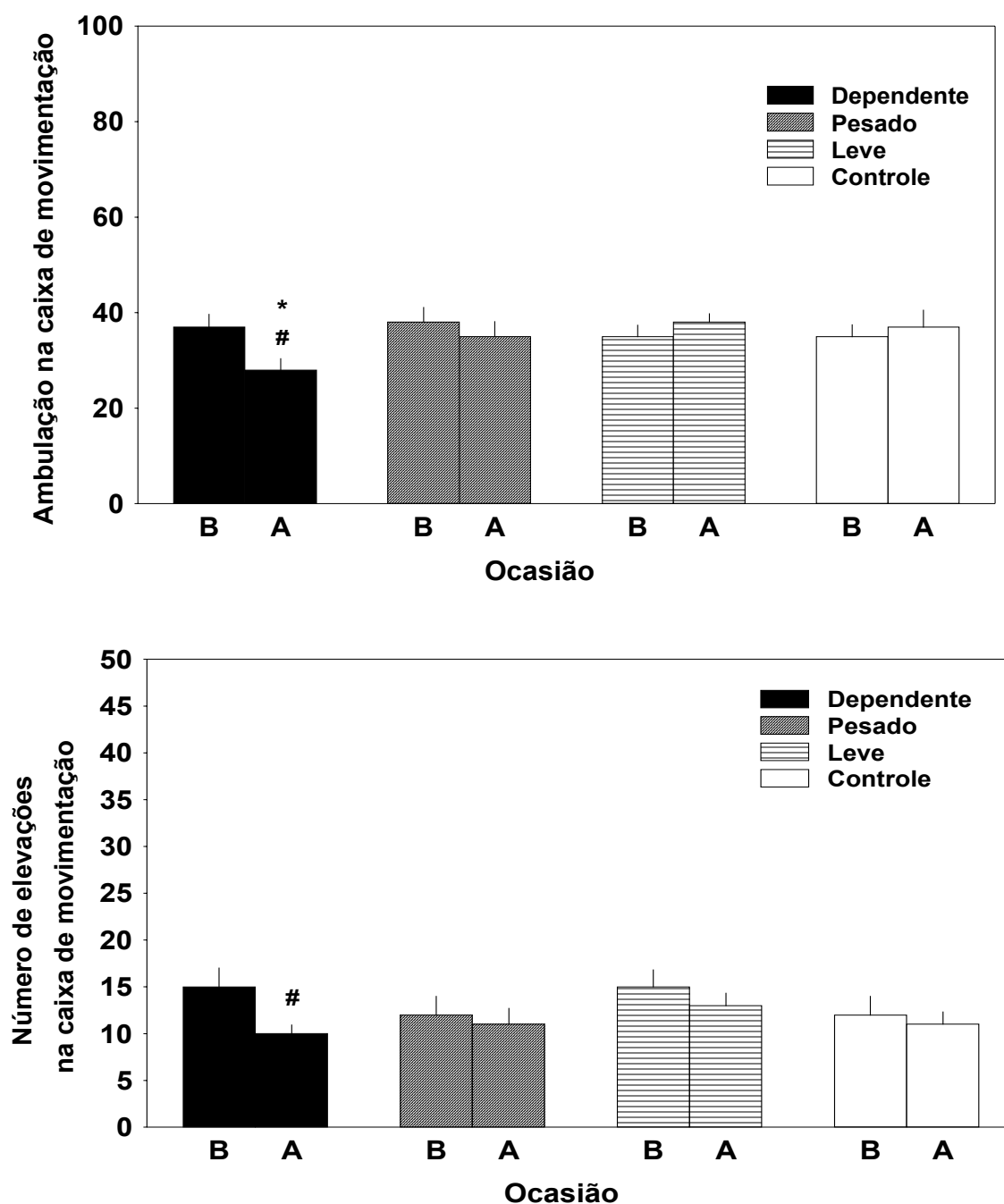


FIGURA 29 –AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL BASAL (B) E NA FASE DE ABSTINÊNCIA (A): Ambulação (parte superior) e número de elevações na caixa de movimentação (parte inferior) avaliados nos testes realizados antes da exposição ao paradigma de livre escolha (B) e após 5 h da retirada das soluções de etanol na fase de abstinência (A) para todos os grupos. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. Os símbolos representam diferenças significantes: # entre as ocasiões no mesmo grupo ($p < 0,05$, teste “t” de Student para amostras dependentes); * de outros grupos na mesma ocasião ($p \leq 0,05$, pelo menos, ANOVA seguida por teste de Newman-Keuls).

5.3 EXPERIMENTO 3: VALIDAÇÃO FARMACOLÓGICA DO MODELO DE DEPENDÊNCIA : TRATAMENTO COM NALTREXONA

5.3.1 Consumo de etanol (g/kg) durante 24h após a administração de naltrexona

A ANOVA de duas vias considerando como fatores os grupos classificados e os tratamentos com as diferentes doses de naltrexona e salina revelou significância para o fator grupo ($F(2,100) = 46,38$, $p \leq 0,0001$) mas não para o fator tratamento ($F(4,100) = 1,21$, $p > 0,05$) nem para a interação entre estes fatores ($F(8,100) = 0,44$, $p > 0,05$).

Na Figura 30 pode-se observar que o grupo D aumentou significativamente o consumo de etanol após o tratamento com naltrexona nas doses 0,125 e 16,0 mg/kg quando comparado ao consumo na fase LE ($F_D(6,30) = 3,92$, $p \leq 0,001$). Para o grupo P a naltrexona não causou alteração no padrão de consumo em relação às fases experimentais do modelo de livre escolha. A única etapa na qual o grupo P reduziu o seu consumo de etanol foi na fase AD em relação a todas as outras etapas experimentais, exceto em relação à fase RE, porém esse dado já foi apresentado anteriormente no Experimento 1 ($F_P(6,48) = 5,24$, $p \leq 0,0001$). Para o grupo L também foi observado um aumento significativo no consumo quando os animais foram tratados com as diferentes doses de naltrexona em relação às fases experimentais anteriores ao tratamento $F_L(6,42) = 13,80$, $p \leq 0,0001$).

Comparações entre os grupos D, P, L e C+LE para cada uma das doses mostraram que na dose N0 o consumo do grupo D e do controle foi maior do que do grupo L ($F(3,25) = 5,28$, $p \leq 0,001$). Na dose N1, o consumo do grupo D foi maior do que dos demais grupos ($F(3,24) = 7,63$, $p \leq 0,01$). Na dose N2 e N3, o consumo do grupo D foi maior do que do L ($F(3,25) = 4,86$, $p \leq 0,05$; $F(3,24) = 4,54$, $p \leq 0,05$, respectivamente).

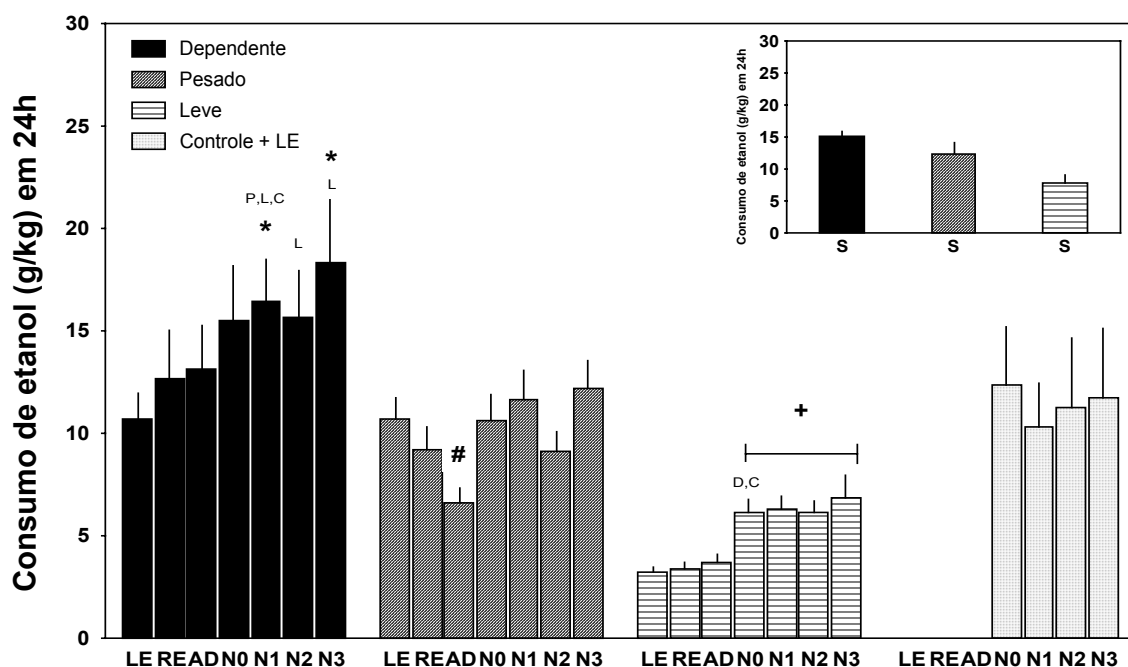


FIGURA 30 – CONSUMO DE ETANOL (g/kg) EM 24h: média \pm erro padrão do consumo de etanol (g/kg) durante um período de 24h apresentado após o tratamento com diferentes doses de naltrexona (N0: 0 mg/kg; N1: 0,125 mg/kg; N2: 2,0 mg/kg; N3: 16,0 mg/kg) e nas diferentes etapas experimentais anteriores ao tratamento (LE: fase de livre escolha, RE: fase de reapresentação, AD: fase de adulteração). O gráfico menor apresentado no canto superior direito representa a média geral do consumo de etanol ao longo de todo o experimento 3 dos grupos dependente, pesado e leve que foram tratados com salina paralelamente aos grupos tratados com naltrexona. As letras D, P, L e C indicam diferenças significantes entre os grupos quando receberam as mesmas doses de naltrexona. Os símbolos representam diferenças significantes: * da LE; # das demais etapas, exceto RE; + da LE, RE e AD. ($p \leq 0,05$, ANOVA, seguida por teste de Newman-Keuls).

5.3.2 Consumo de etanol (g/kg) durante 90 min após a administração de naltrexona

A ANOVA de duas vias considerando como fatores os grupos classificados e os tratamentos com as diferentes doses de naltrexona e salina revelou significância para o fator grupo ($F(2,100) = 24,87$, $p \leq 0,0001$) e para o fator tratamento ($F(4,100) = 5,57$, $p \leq 0,001$) mas não para a interação ($F(8,100) = 0,82$, $p > 0,05$).

Pode-se observar na figura 31 que apenas o grupo P reduziu significativamente o consumo de etanol quando tratado com naltrexona na dose de 2,0 mg/kg em relação ao seu consumo quando tratado com salina (dose N0) ($F_P(3,24) = 4,06$, $p \leq 0,05$; $F_D(3,15) = 2,58$, $p > 0,05$, $F_L(3,21) = 1,86$, $p > 0,05$, $F_{C+LE}(3,12) = 2,78$, $p > 0,05$). Para esse mesmo grupo, a comparação entre o consumo de etanol apresentado pelos animais que receberam salina (dados mostrados no gráfico menor inserido no canto superior direito) e aquele apresentado pelos animais tratados com as diferentes doses de naltrexona mostrou que a naltrexona diminuiu significativamente o consumo de etanol durante o período de 90 minutos nas doses N1, N2 e N3 ($F(4,36) = 4,77$, $p \leq 0,01$). Nos grupos D e L não ocorreu alteração significativa do consumo em nenhuma das doses ($F(4,29) = 1,16$, $p > 0,05$; $F(4,35) = 1,95$, $p > 0,05$, respectivamente). Comparações entre os grupos D, P, L e C+LE considerando cada dose de naltrexona mostraram que na dose N0 o consumo do grupo controle foi maior do que dos grupos L e P ($F(3,25) = 3,16$, $p \leq 0,05$). Na dose N1, não houve diferença significativa entre os grupos ($F(3,24) = 2,79$, $p = 0,06$). Na dose N2, o consumo do grupo D foi maior do que dos demais ($F(3,25) = 7,95$, $p \leq 0,001$). Na dose N3, o consumo do grupo D foi maior do que dos grupos P e L ($F(3,24) = 4,64$, $p \leq 0,05$).

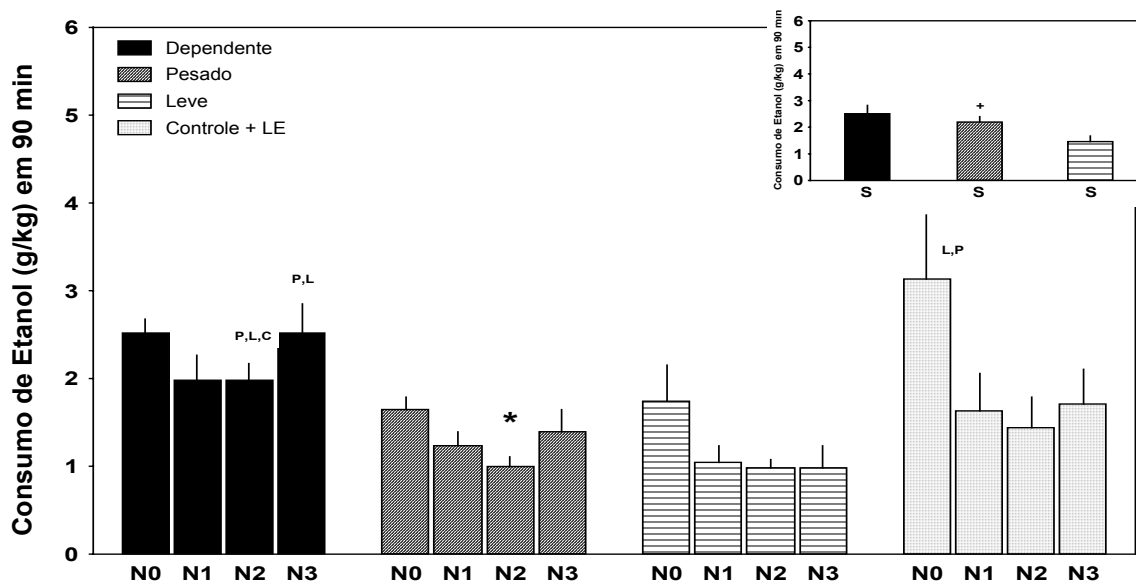


FIGURA 31 – CONSUMO DE ETANOL (g/kg) EM 90 min: Média \pm erro padrão do consumo de etanol (g/kg) em 90 minutos apresentado nas etapas de administração de naltrexona em diferentes doses (N0: 0 mg/kg; N1: 0,125 mg/kg; N2: 2,0 mg/kg; N3: 16,0 mg/kg). O gráfico menor apresentado no canto superior direito representa a média geral do consumo de etanol ao longo de todo o experimento 3 dos grupos dependente, pesado e leve que foram tratados com salina paralelamente aos grupos tratados com naltrexona. Os símbolos representam diferenças significantes: * da dose N0 administrada ao mesmo grupo ($p \leq 0,05$, ANOVA para medidas repetidas, seguida por teste de Newman-Keuls); + das doses N1, N2 e N3 administradas ao grupo pesado; ($p \leq 0,05$, ANOVA seguida por teste de Newman-Keuls). As letras D, P, L e C indicam diferenças significantes entre os grupos quando receberam as mesmas doses de naltrexona ($p \leq 0,05$, ANOVA seguida por teste de Newman-Keuls).

5.3.3 Consumo de água (mL) durante 24h após a administração de naltrexona

A ANOVA de duas vias considerando como fatores os grupos classificados e os tratamentos com as diferentes doses de naltrexona e salina revelou significância para o fator grupo ($F(2,100) = 32,41$, $p \leq 0,0001$) e não para o fator tratamento ($F(4,100) = 1,02$, $p > 0,05$) nem para a interação ($F(8,100) = 0,41$, $p > 0,05$).

Na Figura 32, pode-se observar que o grupo D aumentou significativamente o consumo de água durante o tratamento com naltrexona na dose 0,125 mg/kg quando comparado com a fase LE e na dose 16,0 mg/kg quando comparado às fases LE e RE ($F_D(6,30) = 3,95$, $p \leq 0,001$). Para o grupo P houve um aumento significativo no consumo de água na adulteração e quando os animais foram tratados com as doses de naltrexona quando comparado com o consumo durante as fases de livre escolha e reapresentação ($F_P(6,48) = 9,60$, $p \leq 0,0001$). Para o grupo L também foi observado um aumento significativo no consumo quando os

animais foram tratados com naltrexona em relação às fases anteriores ao tratamento ($F_{L(6,42)} = 7,12$, $p \leq 0,0001$). No grupo C+LE não ocorreu diferença significativa no consumo de água sob efeito das doses de naltrexona ($F_{C+FC(6,24)} = 2,75$, $p > 0,05$) e no grupo C+H₂O o consumo de água na dose de 16,0 mg/kg foi superior ao consumo nas demais etapas ($F_{C+H_2O(6,24)} = 6,63$, $p \leq 0,001$).

Comparações entre os grupos D, P, L, C+LE e C+H₂O para cada uma das doses mostraram que na dose N0 o consumo de água do grupo L foi maior do que do grupo D, P e C+LE e o consumo do grupo C+H₂O foi superior ao do grupo D ($F_{(4,29)} = 6,08$, $p \leq 0,01$). Na dose N1, o consumo do grupo L foi maior do que do grupo D ($F_{(4,28)} = 3,28$, $p \leq 0,05$). Na dose N2 não ocorreu diferença no consumo de água entre os grupos ($F_{(4,29)} = 3,04$, $p > 0,05$) e na dose N3 o consumo dos grupos L e C+H₂O foi maior do que dos grupos D e C+LE ($F_{(4,28)} = 4,71$, $p \leq 0,01$).

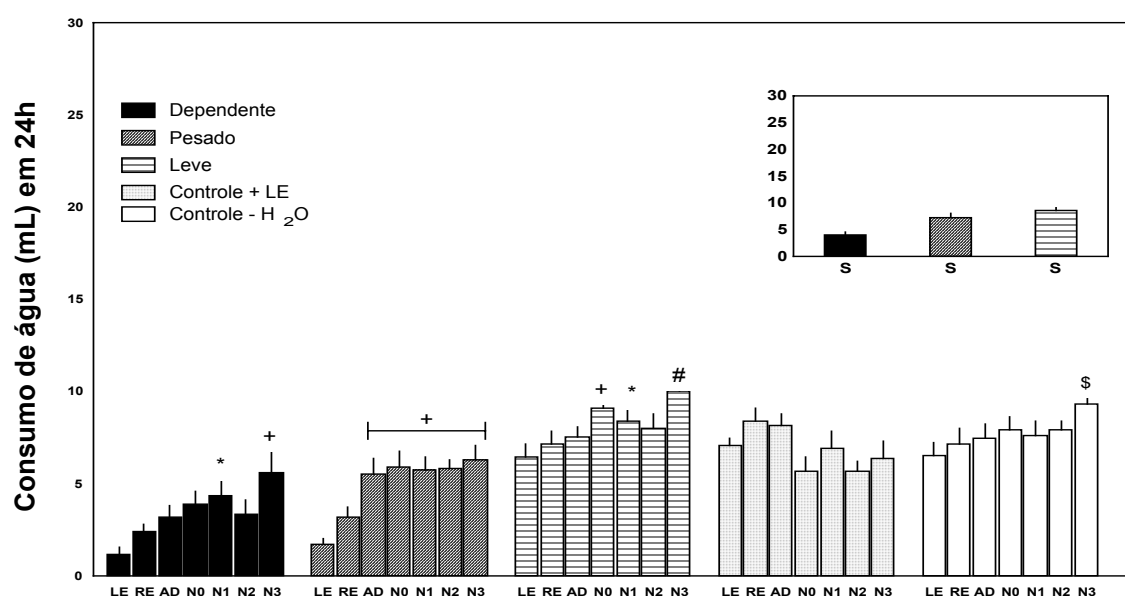


FIGURA 32 – CONSUMO DE ÁGUA (mL) EM 24 h: Média \pm erro padrão do consumo de água (mL) em 24h apresentado nas diferentes etapas experimentais: fase de livre escolha (LE), fase de rerepresentação (RE), fase de adulteração (AD), fases de administração de naltrexona em diferentes doses (N0: 0 mg/kg; N1: 0,125 mg/kg; N2: 2,0 mg/kg; N3: 16,0 mg/kg). O gráfico menor apresentado no canto superior direito mostra a média geral do consumo de água ao longo de todo o experimento 3 dos grupos dependente, pesado e leve que foram tratados com salina paralelamente aos grupos tratados com naltrexona. Os símbolos representam diferenças significantes: + da LE e RE; * da LE; # das demais etapas, exceto N0; \$ de todas as demais etapas, no mesmo grupo. ($p \leq 0,05$, ANOVA seguida por teste de Newman-Keuls).

5.3.4 Consumo de água (mL) durante 90 min após a administração de naltrexona

A ANOVA de duas vias considerando como fatores os grupos classificados e os tratamentos com as diferentes doses de naltrexona e salina revelou significância para o fator grupo ($F(2,100) = 5,97$, $p \leq 0,01$) e não para o fator tratamento ($F(4,100) = 0,29$, $p > 0,05$) nem para a interação ($F(8,100) = 0,07$, $p > 0,05$).

Na Figura 33, pode-se observar que não houve qualquer alteração significativa no consumo de água durante 90 min para as diferentes doses em todos os grupos tratados com naltrexona: ($F_P(3,24) = 0,06$, $p > 0,05$, $F_D(3,15) = 1,74$, $p > 0,05$, $F_L(3,21) = 0,38$, $p > 0,05$, $F_{C+FC}(3,12) = 0,30$, $p > 0,05$, $F_{C+H_2O}(3,12) = 1,24$, $p > 0,05$).

Comparações entre os grupos D, P, L, C+LE e C+H₂O para cada uma das doses mostraram que em nenhuma delas houve diferença significativa no consumo de água entre os grupos: N0 ($F(4,29) = 0,72$, $p > 0,05$), N1 ($F(4,28) = 0,94$, $p > 0,05$), N2 ($F(4,29) = 0,50$, $p > 0,05$) e N3 ($F(4,28) = 0,95$, $p > 0,05$).

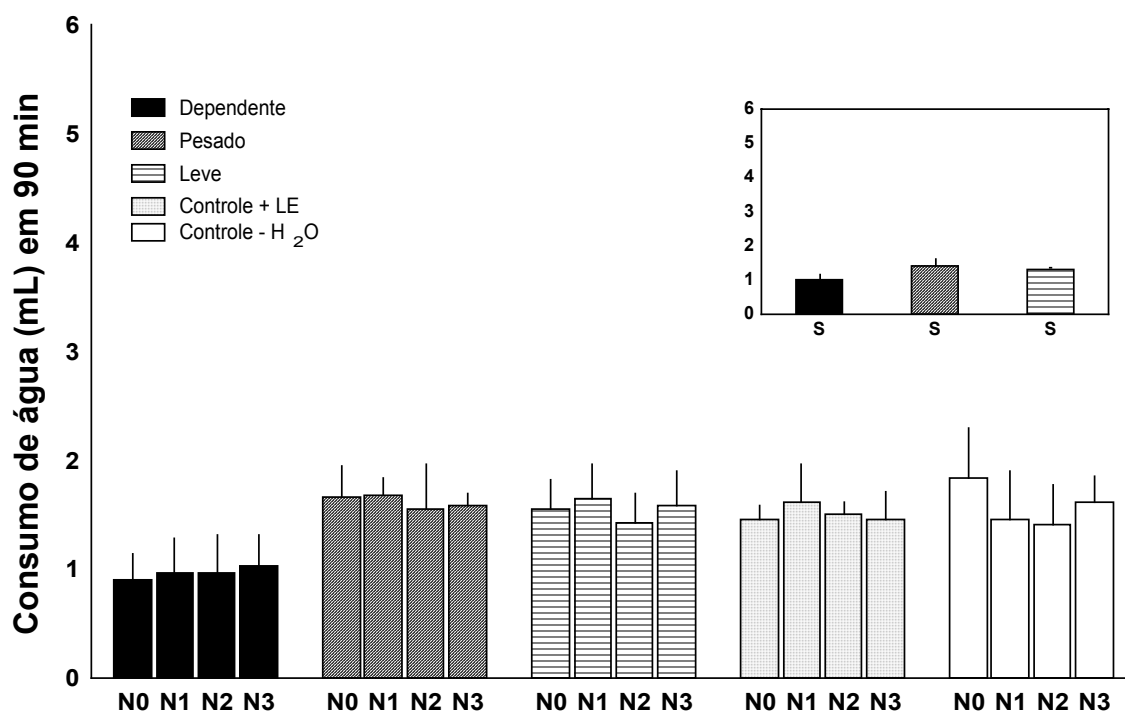


FIGURA 33 – CONSUMO DE ÁGUA (mL) EM 90 min: Média \pm erro padrão do consumo de água (mL) em 90 minutos apresentado nas etapas de administração de naltrexona em diferentes doses (N0: 0 mg/kg; N1: 0,125 mg/kg; N2: 2,0 mg/kg; N3: 16,0 mg/kg). O gráfico menor apresentado no canto superior direito mostra a média geral do consumo de água ao longo de todo o experimento 3 dos grupos dependente, pesado e leve que foram tratados com salina paralelamente aos grupos tratados com naltrexona. (sem diferença significativa; $p \leq 0,05$, ANOVA seguida de teste de Newman-Keuls).

5 DISCUSSÃO

A busca de um modelo animal adequado para o alcoolismo exige técnicas que conduzam a um consumo de álcool pelos animais que seja inelástico, isto é, compulsivo e que não esteja sob controle do pesquisador. O consumo de álcool por um longo período de tempo pode ser separado em três estágios: a iniciação ou aquisição do beber, um comportamento de beber controlado e, eventualmente, um terceiro estágio onde o comportamento de beber se torna incontrolado (SPANAGEL; HOLTER, 1999). Assim, um modelo animal de dependência de álcool que seja correspondente ao que se observa em humanos requer que os animais estejam realmente dependentes e não apenas apresentem alguns sintomas parecidos com aqueles presentes na dependência. Deve ser possível demonstrar que os animais considerados como dependentes tenham perdido o controle sobre o consumo da droga, apresentem comportamento relacionado ao *craving* (desejo compulsivo pela droga) ao antecipar ou preparar o consumo da droga; tanto o desejo aumentado para a droga como a perda do controle não desaparecem espontaneamente durante os períodos de abstinência (APA, 1994; OMS, 1993, ANTON, 1999).

Alguns pontos devem ser considerados para o desenvolvimento de um modelo animal de alcoolismo. O primeiro deles seria o paradigma da **livre escolha** no qual o animal pode manifestar sua preferência quanto a beber água ou etanol bem como quanto a escolher entre as concentrações etílicas ofertadas. A ingestão de álcool em humanos é geralmente auto-decida, ou seja, não imposta, não forçada. A ingestão voluntária inclui a escolha de tomar ou não a droga a qualquer tempo. A administração forçada de uma droga pode conduzir a alguns sinais de dependência como tolerância e sinais de abstinência, mas não parece ser muito provável que resulte em comportamento aditivo. Animais forçados a beber álcool podem apresentar alguns sinais de tolerância e abstinência, mas não precisam necessariamente desenvolver comportamento compulsivo de busca pelo álcool (SPANAGEL; HOLTER, 1999). A administração forçada pode ser aversiva podendo resultar num subsequente consumo voluntário relativamente baixo. O aspecto da voluntariedade pode ser mimetizado em animais através de paradigmas de livre

escolha irrestritos onde o animal pode escolher entre beber água e soluções contendo etanol (HEYNE et al., 2000). Na condição de livre escolha, cada animal pode determinar tanto a dose quanto o padrão temporal de ingestão do álcool. Em modelos de administração forçada, nos quais se disponibiliza aos animais somente a solução etílica, a motivação inicial para beber é a sede, enquanto que no modelo de livre escolha, a motivação está mais relacionada com a própria droga. Segundo Heyne e colaboradores (2000), a administração forçada da droga não levaria à formação de uma “memória do uso da droga” por não ocorrer uma associação entre o desejo de alterar o estado emocional e a busca ou tomada da droga. Ainda, segundo Wolffgramm e Heyne (1995), a administração forçada conduz à dependência física, mas sua eficácia em induzir adição é discutível. Outros autores discutem que forçar ratos a tomar grandes quantidades de etanol dia após dia por ter a solução alcoólica como única fonte de fluido diminui a ingestão de etanol quando os ratos são submetidos à escolha (REID, 1996). Dessa forma, o modelo de livre escolha busca o desenvolvimento da adição de forma mais próxima ao que ocorre no ser humano (validade de face). A presença das duas concentrações de etanol se faz necessária já que há dados apontando que a preferência para a solução etílica mais concentrada (10%) é mais pobre inicialmente (HEYNE et al., 2000). Diante das duas concentrações, os animais podem demonstrar sua preferência ao longo do experimento, a qual varia individualmente. Outro ponto importante é o **tratamento crônico** necessário para o desenvolvimento das várias fases da adição (iniciação, beber controlado e incontrolado). A dependência de etanol no ser humano é um processo lento e gradativo e leva tempo para se desenvolver. A fase de **abstinência** desempenharia um papel importante no desenvolvimento do modelo, pois, baseado na hipótese do reforço negativo do etanol, expor os animais a esta fase promoveria a experiência das conseqüências negativas e desprazerosas da abstinência e induziria o comportamento de recaída na fase de reapresentação da livre escolha entre etanol e água (SPANAGEL; HOLTER, 1999). O uso de substâncias com sabor amargo, como a quinina, provocaria um possível **efeito aversivo** sobre o consumo de etanol. Propõe-se que se os animais continuarem a consumir a droga mesmo com sabor desagradável (aversivo) isto é sugestivo de “procura pela droga” ou *craving*.

O modelo proposto pode ser considerado válido quanto à confiabilidade, pois os padrões de consumo foram replicados cinco vezes em nosso laboratório totalizando em torno de 180 camundongos já submetidos a esse procedimento. A proporção de animais por padrão de consumo tem se mostrado constante, ou seja, 25% dos animais classificados como dependente, 23% como pesado e 26% como leve. (RIBEIRO et al., 2004, submetido).

No presente estudo pode-se demonstrar que quando se expõem camundongos a um paradigma de livre escolha entre álcool e água durante um longo período, alguns deles apresentam preferência pelo etanol mesmo após um período de abstinência ou sob condições aversivas. Outros, apesar de consumir grandes quantidades de álcool, diminuem o seu consumo quando as condições se tornam aversivas. E ainda, outros consomem controladamente pequenas quantidades de etanol, preferindo a água. Essas evidências são sugestivas de um modelo de adição em camundongos com a possibilidade de caracterizar diferentes padrões de consumo de etanol em uma situação análoga àquela observada em humanos. Essas evidências, que também tem sido replicadas nos estudos realizados em nosso laboratório, sugerem que o modelo proposto preenche o critério de validação de face.

Outros autores usando ratos em modelos de dependência semelhantes ao do presente trabalho (ERAVCI et al., 1999; WOLFFGRAMM et al., 2000) descreveram que a duração do procedimento experimental era de no mínimo um ano para caracterizar diferentes padrões de consumo. No presente estudo, foi possível caracterizar padrões distintos de consumo após 16 semanas. Além disso, também foi observada, à semelhança de dados anteriores obtidos em nosso laboratório, correlação positiva entre o consumo de etanol entre as diferentes fases experimentais demonstrando que o padrão individual de consumo é consistente ao longo das fases do modelo. Assim, pode-se concluir que o modelo é consistente com duração mais curta do que a proposta para ratos e desta forma envolvendo menores custos e maior viabilidade.

As observações do presente estudo apresentam analogia com os critérios diagnósticos estabelecidos pelo DSM-IV (APA, 1994) usados para humanos, enfatizando que os animais dependentes mostraram um perfil com as seguintes características: (1) preferência pelo etanol em relação à água durante todas as fases experimentais; (2) “perda do controle” sobre o consumo de etanol evidenciado pelo consumo alto e persistente nas fases de reapresentação e adulteração, sugerindo que o comportamento de procura ao álcool não foi extinto durante a fase de abstinência; (3) consumo de grandes quantidades por longos períodos (cerca de 5 meses; vale lembrar que a vida média total de um camundongo macho Swiss varia de 8 a 12 meses); (4) consumo de etanol mesmo em condições aversivas (após a adulteração do sabor com quinino) o qual pode ser interpretado como “desejo persistente” pelo álcool.

Wolffgramm e Heyne (1995) e Wolffgramm e colaboradores (2000) mostraram que ratos que passaram de um consumo controlado para uma demanda aumentada perderam seu controle sobre a ingestão da droga permanentemente. Após a fase de abstinência do álcool, estes animais consumiram muito mais etanol do que os bebedores controlados e mantiveram seu padrão elevado de consumo sob circunstâncias aversivas (adulteração das soluções de etanol com quinino). Esses autores sugeriram que esses animais tinham atingido o critério de “perda do controle” atingindo o estado de dependência/adicção. No mesmo sentido, no presente trabalho, o critério mais importante para considerar um camundongo como dependente foi a observação de ausência de redução no consumo de etanol nas fases de reapresentação e adulteração em relação ao consumo anterior à abstinência, podendo ser interpretado como comportamento de procura à droga ou *craving*. Além disso, no presente trabalho, com a fase de tratamento com naltrexona os animais foram submetidos a vários períodos de abstinência do etanol entre as doses administradas e esse procedimento levou ao aumento do consumo nos animais dependentes.

Em humanos dependentes, a motivação para procurar e usar a droga parece ser compulsiva. O termo *craving* é usado freqüentemente para descrever esse estado (ANTON, 1999; ROBINSON; BERRIDGE, 1993) e tem até sido sugerido como critério para diagnóstico de dependência. Entretanto, como o *craving* é uma tentativa de descrição de um estado motivacional psíquico, ele não pode ser medido

diretamente. Em humanos utilizam-se questionários para avaliar o *craving* (POTGIETER; DECKERS; GEERLINGS, 1999), pois ainda não existem medidas objetivas específicas (WEINSTEIN et al., 1998). Dados obtidos em humanos usuários de álcool ou drogas não esclarecem se o *craving* é uma forma pronunciada de “querer” (ROBINSON; BERRIDGE, 1993, 2001; TIFFANY; CARTER, 1998) e que se manifestaria igualmente em consumidores controlados e em adictos, ou se é um fenômeno distinto que está relacionado com a “perda do controle” e que ocorreria especificamente nos adictos. A proposta do tratamento anti-*craving* é atenuar o desejo do adicto para o álcool ou drogas. Esta estratégia não ataca primariamente a perda de controle e sim suas conseqüências, podendo ser considerado assim um tratamento sintomático. Drogas anti-*craving* deveriam prolongar o tempo para recaída por aliviar o desejo compulsivo para a droga, mas o desejo ainda permanece. Dessa forma, estratégias anti-*craving* provavelmente não afetam as causas do transtorno (WOLFFGRAMM et al., 2000).

Alguns modelos animais refletem a motivação para procurar e consumir a droga, citando como exemplos o condicionamento de preferência de lugar (CARR; FIBIGER; PHILLIPS, 1989), condicionamento operante de lugar (GÖTZ; WOLF; WOLFFGRAMM, 1992; GÖTZ; WOLFFGRAMM, 1993), acesso operante ao álcool ou drogas (SAMSON et al., 1998) e outros procedimentos que utilizam o deslocamento do animal para um objetivo para quantificar a preferência por uma droga. Esses procedimentos provavelmente são mais úteis para medir a preferência pela droga em animais ingênuos ou em consumidores controlados do que para avaliar *craving* em animais adictos (WOLFFGRAMM et al., 2000).

Durante um período de abstinência supõem-se que os animais experimentam efeitos desagradáveis induzidos pela retirada abrupta da droga, que no presente trabalho podem ter sido evidenciados pela ansiedade exibida pelos animais dependentes e consumidores pesados (redução significativa na ambulação no campo aberto e aumento significativo no tempo de permanência na área central do labirinto) (RODGERS; JOHNSON, 1995; PRUT; BELZUNG, 2003). O grupo dependente também apresentou redução da atividade exploratória durante a abstinência (redução da ambulação e do número de elevações na caixa de movimentação). De maneira análoga, humanos exibem ansiedade, humor deprimido e irritabilidade durante a síndrome de abstinência. A experiência dos efeitos

desagradáveis experimentados durante a abstinência pode representar as propriedades reforçadoras negativas do etanol propiciando a volta ao consumo na fase de reapresentação, efeito esse observado no presente trabalho (KOOB; LE MOAL, 1997, 2001; KOOB, 2000; SPANAGEL et al., 1995).

O efeito da privação do álcool, que foi descrito primeiramente por Sinclair e Senter (1967) tem sido considerado como modelo de recaída (SPANAGEL; HÖLTER, 1999, 2000). Wolffgramm e colaboradores (2000) provaram que o efeito da privação estava relacionado mais com o consumo controlado do que com a adição. Após várias semanas de privação do álcool os bebedores controlados consumiram doses diárias maiores do que antes da privação, porém esse efeito foi passageiro. Em contraste, os animais adictos mantiveram seu alto consumo de droga. Esses autores também provaram que o modelo proposto era efetivo em prever uma intervenção farmacológica efetiva em humanos dependentes com o emprego de agentes anti-dopaminérgicos. Esses autores sugeriram que o procedimento proposto por eles não era um modelo de recaída. O argumento principal usado por eles foi que um paciente quando está tentando ficar abstinente mantém latente seu comportamento aditivo que pode readquirir “poder” sobre ele a qualquer momento. Quando isso acontece, ocorre a recaída na tentativa de suprimir o desejo latente pelo álcool. Porém, ratos ou camundongos não suprimem o desejo pelo álcool quando a substância está disponível e conseqüentemente não é possível criar uma situação de recaída em animais adictos. Num modelo animal que utiliza um constructo semelhante ao nosso ou ao de Wolffgramm e colaboradores (2000) seria somente possível detectar e quantificar “perda de controle”.

A variabilidade individual quanto ao consumo de etanol observada no presente estudo foi grande permitindo a caracterização de diferentes perfis de consumo. Essa variabilidade pode ser interpretada como diferenças na susceptibilidade aos efeitos do etanol capazes de induzir neuroadaptações que levaram a padrões comportamentais distintos de consumo e de procura pelo álcool. Essa observação fortalece a relevância do modelo proposto uma vez que ele reflete uma das características mais proeminentes vista em humanos, ou seja, a grande variabilidade na susceptibilidade individual para desenvolver dependência e incorpora o

desenvolvimento “natural” na progressão do consumo controlado para a perda do controle (RIBEIRO et al., 2004, submetido).

Todas as evidências discutidas até o momento relacionam-se com a validação de face e a confiabilidade do modelo. A validação preditiva do modelo proposto decorre dos resultados do experimento 3, que visava a validação farmacológica do modelo, e que demonstrou que a naltrexona foi efetiva em reduzir o consumo de etanol. Esse efeito foi observado pelo consumo apresentado após 90 minutos de acesso ao etanol e não foi evidente quando se avaliou o consumo durante 24 horas. Essa observação pode ser explicada pela diminuição dos níveis plasmáticos da naltrexona ao longo de 24 horas, de maneira que somente durante as primeiras horas após a sua administração o padrão de consumo de etanol é alterado e no decorrer das 24 horas esse padrão se restabelece (MISRA et al., 1976; REID; HUBBELL, 1992; PARKES; SINCLAIR, 2000).

A dose mais efetiva em reduzir o consumo de etanol foi a de 2,0 mg/kg. Sob efeito desta dose, houve redução significativa do consumo de etanol avaliado durante 90 minutos de livre acesso para o grupo pesado e uma redução não significativa para os grupos dependente e leve. Para o grupo pesado houve diminuição significativa do consumo de etanol também sob efeito da menor (0,125 mg/kg) e da maior doses (16,0 mg/kg). A escolha dessas doses baseou-se em trabalhos de outros autores que utilizaram camundongos como sujeitos experimentais, empregando diversas doses de naltrexona (GRAHAME et al., 2000). Outros autores também relataram efeitos deste composto diminuindo o consumo de etanol empregando outras doses, porém dentro do intervalo utilizado no presente trabalho (MIDDAUGH; LEE; BANDY, 2000 MIDDAUGH et al., 2003).

O consumo de água também foi avaliado nas mesmas situações em que o consumo de etanol foi quantificado. O seu consumo durante 90 minutos não foi alterado significativamente tanto nos animais classificados como dependente, pesado e leve como nos animais controle. Em resumo, o consumo de água não foi alterado significativamente pela administração de naltrexona e o consumo de etanol foi reduzido significativamente para o grupo pesado. Isso sugere uma ação específica da naltrexona sobre o consumo de etanol e não uma supressão mais geral da motivação apetitiva.

Apesar de a naltrexona ter diminuído o consumo de etanol nos animais submetidos ao modelo de livre escolha, ocorreu o contrário do que se esperava considerando-a como droga “anti-*craving*”, ou seja, a não supressão do consumo nos animais dependentes. Isso sugere uma ação da naltrexona sobre o reforço positivo do etanol e que influenciaria mais os bebedores controlados, os quais estariam consumindo etanol pelas suas propriedades reforçadoras positivas. Os animais dependentes que perderam o controle sobre a ingestão do álcool não seriam responsivos à naltrexona e desta forma, a sua sugerida ação como anti-*craving* seria questionada pelos presentes dados.

A naltrexona é um antagonista opióide com graus de afinidade variável para os subtipos de receptores μ , δ e κ . Experimentos com animais de laboratório têm indicado que a naltrexona, ou o outro antagonista com perfil semelhante mas de curta duração, naloxona, podem reduzir o consumo de etanol em camundongos (LÉ et al., 1993; PHILLIPS; WENGER; DOROW, 1997), ratos (FROEHLICH et al., 1990, 1991; HUBBELL; REID, 1988) e primatas não-humanos (BOYLE et al., 1998, KORNET; GOOSEN; VAN REE, 1991; WILLIAMS; WOODS, 1998). Outros trabalhos têm indicado que a naloxona pode reduzir a resposta de pressão à barra em ratos que trabalham pelo reforço do etanol (HYTYIÄ; SINCLAIR, 1993; SAMSON; DOYLE, 1985; SCHWARZ-STEVENSON; FILES; SAMSON, 1992; WEISS et al., 1990) e também efeito semelhante usando naltrexona foi relatado para camundongos da linhagem C57BL/6 (B6) privados (MIDDAUGH et al., 1999) e não privados de alimento (MIDDAUGH; LEE; BANDY, 2000).

A maioria dos ensaios clínicos testando a naltrexona para tratamento do alcoolismo tem demonstrado efeitos benéficos desta droga em prevenir a recaída tanto quando se consideram as evidências que deram suporte para a aprovação pelo FDA da naltrexona como farmacoterapia do alcoolismo (ANTON et al., 1999; O'MALLEY et al., 1992; VOLPICELLI et al., 1992) como em estudos de revisão avaliando sua eficácia (CARMEN et al., 2004), embora existam resultados negativos (KRYSTAL et al., 2001, KRANZLER; MODESTO-LOWE; VAN KIRK, 2000) ou inconclusivos (FROEHLICH et al., 2003) que colocam em dúvida a eficácia da naltrexona. Para esses resultados negativos e inconclusivos, a droga não mostrou

ser melhor que o placebo, inclusive em prevenir a recaída. O estudo de Krystal e colaboradores (2001) consistiu de uma avaliação multicêntrica ampla, duplo-cega, placebo-controlada, no entanto foi conduzida principalmente com homens mais velhos, veteranos de guerra e com alcoolismo mais severo, o que pode explicar, pelo menos em parte, os resultados obtidos (WEISS; PORRINO, 2002; MARK et al, 2002). Sobre esse estudo os editores do *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* (NIAAA), Richard K. Fuller e Enoch Gordis, comentaram que os seus resultados “não podem ser generalizados para pessoas que não sejam veteranos de guerra, como mulheres ou pacientes cuja dependência do álcool seja recente” e acrescentaram “que dois terços dos veteranos não vivem com suas esposas e um terço recebe pensão por incapacidade física, fatores que podem reduzir a motivação e a habilidade para parar de beber”. Esses editores concluem que, até que mais informações sejam disponíveis, os clínicos devem continuar a prescrever o antagonista do receptor opióide (FULLER; GORDIS, 2001). O outro estudo compara naltrexona com nefazodone, um bloqueador do receptor 5-HT₂, e placebo, tem um desenho complicado com muitas doses tomadas por dia. Em contraste com achados de outros estudos, este encontrou que os efeitos colaterais no grupo naltrexona foram altos, levando à não-aderência. A razão para esta discrepância com outros estudos publicados não é clara (KRANZLER; MODESTO-LOWE; VAN KIRK, 2000; ANTON, 2001).

Diante de tantas evidências favoráveis, não se entende ainda porque a naltrexona seja tão pouco utilizada na prática clínica. Vários estudos têm sido direcionados para responder esta questão (THOMAS, 2003; MARK; KRANZLER; SONG, 2003; MARK, et al., 2003; GASTPAR, 2002). Numa pesquisa realizada entre médicos especialistas em abuso de substâncias nos EUA, levantou-se que, do total de prescrições realizadas para pacientes com alcoolismo, somente 13% foram de naltrexona, enquanto que 46% foram antidepressivos e 11% benzodiazepínicos (MARK et al, 2002). Isso reflete uma realidade percebida ao longo desta última década desde que a naltrexona foi liberada para tratamento do alcoolismo. O fato gera certa surpresa já que vários estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram a eficácia desta droga, levando a uma certa aceitação geral dela como eficaz. Podem ser listadas diversas causas para a pouca expansão do uso deste que é um dos

poucos medicamentos aprovados para o tratamento da recaída, entre elas destacou-se a percepção dos médicos de um tamanho do efeito da naltrexona considerado pequeno a médio, gerando uma falta de confiança na eficácia do tratamento com esta droga. Apesar de os clínicos estarem conscientes da vantagem, estatisticamente comprovada, que a naltrexona tem mostrado na maioria dos ensaios clínicos, eles consideram o efeito sendo de modesta significância clínica. Os médicos parecem sentir-se mais confortáveis prescrevendo antidepressivos do que a droga aprovada para tratar alcoolismo.

Um estudo conduzido em pacientes alcoolistas usando a combinação de naltrexona e sertralina, um inibidor seletivo da recaptção de serotonina, mostrou ser mais efetivo do que o uso de naltrexona sozinha (FARREN et al., 2000). Esse estudo se fundamentou em evidências pré-clínicas usando ratos da linhagem P (preferring) para os quais a associação de naltrexona com fluoxetina ou com ondansetron, um antagonista do receptor 5HT₃, foram mais efetivas do que as substâncias sozinhas (LÊ; SELLERS, 1996; REZVANI et al., 2000, MONTI et al., 2004). Um outro estudo recente em camundongos mostrou que a associação de naltrexona e acamprosato é mais efetiva do que os tratamentos isolados em reduzir o consumo de etanol (KIM et al., 2004).

Segundo Spanagel e Zieglgänsberger (1997), ainda é discutível se a ação da naltrexona em prevenir a recaída em humanos, ou prevenir a reinstalação do beber em animais de laboratório, depende somente de um bloqueio direto do reforço induzido pelo álcool ou se efeitos anti-*craving* seriam também importantes. Embora a naltrexona tenha sido chamada um composto “anti-*craving*”, os dados suportando a distinção entre este tipo de composto e compostos que são direcionados a outros fatores no abuso do álcool, tais como abstinência ou comportamento impulsivo, não são consistentes (ANTON, 2001). Dizer que a naltrexona é uma droga anti-*craving*, isto é, que reduz o *craving* para o álcool ainda é questionável e mais investigação é necessária, pois o fenômeno do *craving*, o qual se pensa estar presente nos animais dependentes e não nos do grupo pesado, envolve vários aspectos e não somente o reforço positivo da droga.

Estudos demonstram que a naltrexona modifica a palatabilidade de sabores como doce, salgado, amargo e do etanol. No caso do etanol, ocorre uma diminuição da resposta ingestiva e aumento da resposta aversiva para as soluções

etílicas testadas (10, 20 e 40% v/v) (RICHTER; CAMPBELL, 1940; FERRARO III et al., 2002). Desta forma pode-se inferir que as alterações na palatabilidade interferem mais com o consumo de bebedores controlados, como o grupo pesado e leve, do que com o consumo do grupo dependente.

O emprego do grupo controle+LE, o qual nunca havia tido contato com o etanol anteriormente, teve como objetivo analisar se o consumo de etanol por esses animais seria alterado pela naltrexona, avaliando o seu papel sobre uma possível inibição inespecífica do beber etanol. Este grupo demonstrou consumo de etanol elevado e variável, o que foi semelhante ao perfil dos outros animais no início do modelo (fase de aquisição). Se a naltrexona inibisse inespecificamente o consumo de etanol, o seu consumo seria muito pequeno ou, pelo menos, semelhante ao do grupo leve, o que não ocorreu. Isso sugere que a ação da naltrexona não foi inespecífica, mas sim que interferiu diferentemente sobre os diferentes padrões de consumo.

Dentre outras, duas hipóteses têm sido sugeridas para explicar como a naltrexona diminui a ingestão de etanol. A hipótese do excesso (*surfeit hypothesis*) postula que “um excesso da atividade opioidérgica seria um evento crítico que aumentaria a frequência e extensão da ingestão de etanol, o que levaria à perda do controle”. Um alto nível basal da atividade opioidérgica, um aumento nesta atividade, ou ambos, poderia ser uma condição poderosa para aumentar a ingestão de etanol. Um aumento na atividade opióide endógena aumentaria a propensão para o consumo de álcool (REID, 1996). Em outras palavras, um aumento da atividade opioidérgica seria um evento que diretamente levaria as pessoas ou animais a beber álcool. O bloqueio do excesso desta atividade por um antagonista opióide reduziria o beber e o risco de perda de controle. A outra hipótese, chamada de hipótese da extinção postula que “a atividade opioidérgica reforça o beber álcool e a naltrexona bloquearia este reforço” (PARKES; SINCLAIR, 2000). Se o etanol é consumido enquanto a naltrexona está presente, o comportamento de beber seria extinto. As ações anti-recaída da naltrexona seriam dependentes de um componente associativo pelo qual o indivíduo aprenderia através de repetidas experiências que o etanol não é mais reforçador quando tomado concomitantemente com o antagonista opióide (WEISS; PORRINO, 2002). Ou seja, a naltrexona não afetaria os eventos do “antes” de beber ou que levariam a beber (motivação, *craving*, perda de controle),

mas afetaria apenas a quantidade de reforço obtido após beber e, assim, causaria mudanças na probabilidade do beber subsequente. Segundo esta hipótese, a naltrexona não seria uma droga anti-*craving*, porque o *craving* é um evento “antes” e o reforço é um evento “depois” de beber.

O efeito supressor do consumo de etanol em modelos de auto-administração em ratos usando antagonistas opióides têm indicado o envolvimento dos subtipos de receptores μ e δ . A injeção direta de naltrindol, um antagonista específico do receptor δ , ou de CTOP, um antagonista específico do receptor μ , em regiões cerebrais envolvidas na resposta reforçadora do etanol demonstrou que o núcleo accumbens (NAc) e a amígdala basolateral (Abl) estão diretamente envolvidos na resposta mediada pelos opióides. No NAc há o predomínio de receptores δ e na Abl ocorrem os dois subtipos. A administração de ambos os antagonistas específicos na área tegmental ventral (ATV) não alterou significativamente o consumo de etanol sugerindo que o comprometimento descrito dessa estrutura nas propriedades reforçadoras do etanol (GATTO et al., 1994) não está associado com o sistema opióide. (FROELICH et al., 2003). Essas evidências podem sugerir que o sistema opióide tenha um papel preferencial sobre os circuitos envolvidos nas propriedades reforçadoras e com menor envolvimento em circuitos que podem ser essenciais na instalação do *craving*, podendo explicar a ausência de efeito redutor do consumo de etanol nos camundongos considerados dependentes no presente modelo.

Entre os medicamentos aprovados para reduzir as recaídas em alcoolistas, citam-se principalmente a naltrexona e o acamprosato. Cole e colaboradores (2000) desenvolveram um modelo para estudar os estímulos condicionados ao uso do álcool, no qual foram pareadas a administração repetida de etanol com a exposição ao labirinto em cruz elevado. Os efeitos da naltrexona e do acamprosato sobre o comportamento condicionado à abstinência ao etanol foram testados para avaliar se essas drogas reduziram o reforço negativo causado pela expectativa dos efeitos do etanol. Como esperado pelos autores, apenas o acamprosato reduziu o comportamento condicionado à abstinência do etanol, pois existem evidências de que o acamprosato atua sobre as propriedades reforçadoras negativas do etanol enquanto que a naltrexona atua sobre as positivas. Os autores sugerem que esse modelo possa ser útil para estudar drogas efetivas no controle das recaídas ao uso do álcool (COLE; LITTLETON; LITTLE, 2000).

Os resultados do presente trabalho sugerem que a naltrexona interferiu no consumo de etanol, mas não no comportamento de busca pelo álcool presente no grupo dependente, sugerindo que esta droga reduziria a ingestão de etanol, mas não seria efetiva para controlar o *craving* pelo álcool. No entanto, mais estudos devem ser realizados para confirmar ou não as evidências apresentadas, salientando que um estudo de validação farmacológica do modelo proposto utilizando o acamprosato já está sendo conduzido.

7 CONCLUSÕES

- Foi possível caracterizar diferentes padrões de consumo de etanol entre camundongos expostos a um modelo de dependência por livre escolha, em um curto período de tempo.
- Animais com perfil de consumidor dependente apresentaram um comportamento sugestivo de manifestação de *craving*, demonstrado pela perda de controle sobre o consumo de etanol constatada pela manutenção do consumo e da preferência pelo álcool após período de abstinência e mesmo em condições aversivas.
- Animais com perfil de consumidor pesado demonstraram alto consumo e preferência pelo etanol, diminuindo em condições aversivas, representando um possível controle sobre o consumo da droga.
- Animais com perfil de consumidor leve apresentaram baixo consumo de etanol e preferência pela água.
- Os animais dos grupos D e P mostram comportamento sugestivo de ansiedade durante a abstinência, sugerindo dependência física nestes grupos.
- Os resultados do experimento de validação preditiva mostraram que a naltrexona reduziu o consumo de etanol nos animais do grupo pesado, mas ao contrário do esperado, não reduziu no grupo dependente. Isso sugere que a naltrexona interfere no consumo de etanol, mas não no comportamento de procura pelo álcool, presente no grupo dependente. Assim, questiona-se o efeito da naltrexona como medicamento eficaz no controle do *craving* pelo álcool.
- O modelo proposto mostrou-se válido: quanto à confiabilidade, pois os padrões de consumo puderam ser replicados com consistência e estabilidade; quanto à validade de face, mimetizando os critérios diagnósticos para dependência ao álcool em humanos; e quanto à validade preditiva, reduzindo o consumo de etanol através do tratamento com naltrexona.

REFERÊNCIAS

AHMED, S .H.; KOOB, G. F. Transition from moderate to excessive drug intake: change in hedonic set point. **Science**, v. 282, p. 298-300, 1998.

AHMED, S. H.; KOOB, G. F. Long lasting increase in the set point for cocaine self-administration after escalation in rats. **Psychopharmacology**, v. 146, p. 303-312, 1999.

AHMED, S. H.; WALKER, J. R.; KOOB, G. F. Persistent increase in the motivation to take heroin in rats with a history of drug escalation. **Neuropsychopharmacology**, v. 22, p. 413-421, 2000.

ALTSHULER, H. L.; PHILLIPS, P. E.; FEINHANDLER, D. A. Alteration of ethanol self-administration by naltrexone. **Life Science**, v. 26, p. 679-688, 1980.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION - APA. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. Washington, DC: American Psychiatry Association, 4. ed., 1994.

ANDREATINI, R. A. Importância dos modelos animais em psiquiatria. **Revista Brasileira Psiquiatria**, v. 24, n. 4, p. 164, 2002.

ANTON, R. F. What is craving? Models and implications for treatment. **Alcohol Research & Health**, v. 23, p. 165-173, 1999.

ANTON, R. F. et al. Naltrexone and cognitive behavioral therapy for the treatment of outpatient alcoholics: results of a placebo-controlled trial. **American Journal of Psychiatry**, v. 11, p. 1758-1764, 1999.

ANTON, R. F. Pharmacologic approaches to the management of alcoholism. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 62 (Suppl. 20), p. 11-17, 2001.

BOERNGEN-LACERDA, R.; SOUZA-FORMIGONI M. L. O. Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 67, n. 2, p. 225-232, 2000.

BOYLE, A. E. L. et al. Effects of acute and chronic doses of naltrexone on ethanol self-administration in Rhesus monkeys. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 22, p. 359-366, 1998.

BRANDT, M. R.; FRANCE, C. P. Chronic 1-alpha acetylmethadol in rhesus monkeys: discriminative stimulus and other behavioral measures on dependence and withdrawal. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 287, p. 1029-1037, 1998.

CARLINI, E. A. et al. **I Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil – 2001**. São Paulo: CEBRID – Unifesp, 2002.

CARMEN, B. et al. Efficacy and safety of naltrexone and acamprosate in the treatment of alcohol dependence: a systematic review. **Addiction**, v. 99, n. 7, p. 811-28, 2004.

CARR, G. D.; FIBIGER, H. C.; PHILLIPS, A. G. Conditioned place preference as a measure of drug reward. In: LIEBMAN, J. M.; COOPER, S. J. (eds.). **The Neuropharmacological basis of reward**. Clarendon Press, Oxford, p. 264-319, 1989.

CHILDRESS, A. R. et al. Classically conditioned responses in opioid and cocaine dependence: A role in relapse? **NIDA Res. Monogr.**, v. 84, p. 25-43, 1988.

COLE, J. C.; LITTLETON, J. M.; LITTLE, H. J. Acamprosate, but not naltrexone, inhibits conditioned abstinence behaviour associated with repeated ethanol administration and exposure to a plus-maze. **Psychopharmacology**, v. 147, n. 4, p. 403-11, 2000.

COLOMBO, G. ESBRA-Nordmann 1996 Award Lecture: Ethanol drinking behavior in Sardinian alcohol-preferring rats. **Alcohol Alcoholism**, v. 32, p. 443-453, 1997.

COPER, H.; ROMMELSPACHER, H.; WOLFFGRAMM, J. The “point of no return” as a target of experimental research on drug dependence. **Drug Alcohol Dependence**, v. 25, p. 129-134, 1990.

CRABBE, J. C.; WAHLSTEN, D.; DUDEK, B. C. Genetics of mouse behavior: Interactions with laboratory environment. **Science**, v. 284, p. 1670-1672, 1999.

CUNNINGHAM, C. L.; FIDLER, T. L.; HILL, K. G. Animal models of alcohol's motivational effects. **Alcohol Research & Health**, v. 24, p. 85-92, 2000.

EMMETT-OGLESBY, M. W. et al. Animal models of drug withdrawal symptoms. **Psychopharmacology**, v. 101, p. 292-309, 1990.

ERAVCI, M. et al. Gene expression of glucose transporters and glycolytic enzymes in the CNS of rats behaviorally dependent on ethanol. **Molecular Brain Research**, v. 65, p. 103-111, 1999.

FARREN, CK et al. Combination pharmacotherapy in alcoholism: a novel treatment approach. **CNS Spectrums**, v. 5, p. 70-76, 2000.

FERRARO III, F.M. et al. Naltrexone modifies the palatability of basic tastes and alcohol in outbred male rats. **Alcohol**, v. 27, p. 107-114, 2002.

FIELLIN, D. A.; REID, C.; O'CONNOR, P. G. New therapies for alcohol problems: application to primary care. **American Journal Medicine**, v. 108, p. 227-237, 2000.

FROEHLICH, J. C. et al. Naloxone attenuates voluntary ethanol intake in rats selectively bred for high ethanol preference. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 35, p. 385-390, 1990.

FROEHLICH, J. C. et al. Importance of delta opioid receptors in maintaining high alcohol drinking. **Psychopharmacology**, v. 103, p. 467-472, 1991.

FROEHLICH, J. C. et al. Contribution of the opioid system to alcohol aversion and alcohol drinking behavior. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 287, p. 284-292, 1998.

FROEHLICH, J. C. et al. Preclinical and clinical studies on naltrexone: What have they taught each other? **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 27, n. 3, p. 533-539, 2003.

FULLER, R. K.; GORDIS E. Naltrexone treatment for alcohol dependence [editorial]. **New England Journal Medicine**, v. 345, p.1770-1771, 2001.

GASTPAR, M. et al. Lack of efficacy of naltrexone in the prevention of alcohol relapse: results from a German multicenter study. **Journal Clin Psychopharmacology**, v.22, n. 6, p. 592-598, 2002.

GATTO, G. J. et al. Ethanol self-infusion into the ventral tegmental area by alcohol-preferring rats. **Alcohol**, v. 11, p. 557-564, 1994.

GEYER, M. A.; MARKOU, A. Animal models of psychiatric disorders. In: **Psychopharmacology: the Fourth Generation of Progress**. BLOOM, F. E.; KUPFER, D. J. (eds.) Raven Press, New York, p. 787-798, 1995.

GÖTZ, E.; WOLF, U.; WOLFFGRAMM, J. Reward by drug taking: operant place preference conditioning as a method to investigate the role of dopaminergic transmission. Em: RICHTER, D.; ELSNER, N. (eds.) **Rhythmogenesis in neurons and networks**. Thieme, Stuttgart , p. 682-693, 1992.

GÖTZ, E.; WOLFFGRAMM, J. Dopaminergic sensitivity and reward: experiments with operant place preference conditioning. Em: ELSNER, N.; HEISENBERG, M. (eds.) **Gene-brain-behavior**. Thieme, Stuttgart, p. 702-715, 1993.

GRAHAME, N. J. et al. Naltrexone and alcohol drinking in mice lacking β -endorphin by site-directed mutagenesis. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 67, p. 759-766, 2000.

GUIMARÃES, F. S. Modelos experimentais de doenças mentais. **Revista ABP-APAL**, v. 15, n. 4, p. 149-52, 1993.

HEYMAN, G. M. An Economic approach to animal models of alcoholism. **Alcohol Research & Health**, v. 24 (Suppl. 2), p. 132-140, 2000.

HEYNE, A. et al. Persisting consequences of drug intake: towards a memory of addiction. **Journal of Neural Transmission**, v. 107, p. 613-638, 2000.

HOLTER, S. M. et al. Kappa-opioid receptors and relapse-like drinking in long-term ethanol-experienced rats. **Psychopharmacology**, v. 153, p. 93-102, 2000.

HUBBELL, C. L.; REID, L. D. Opioids modulate rats' intakes of alcoholic beverages. In: **Opioids, Bulimia, and Alcohol Abuse and Alcoholism**, REID, L. D. (ed.), p. 145-174, Springer-Verlag, New York, 1988.

HYTYIÄ, P.; KIIANMAA, K. Suppression of ethanol responding by centrally administered CTOP and naltrindole in AA and Wistar rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 25, p. 25-33, 2001.

HYTYIÄ, P.; SINCLAIR, J. D. Responding for oral ethanol after naloxone treatment by alcohol-preferring AA rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 17, p. 631-636, 1993.

INGMAN, K. et al. Selective delta-opioid receptor antagonist N,N(CH₃)₂-Dmt-Tic-OH does not reduce ethanol intake in alcohol-preferring AA rats. **Addict. Biol.**, v. 8, p. 173-179, 2003.

JENTSCH, J. D. et al. Establishing orally self-administered cocaine as a reinforcer in rats using home-cage pre-exposure. **Progress in Neuropsychopharmacol & Biological Psychiatry**, v. 22, p. 229-239, 1998.

KIM, S. G. et al. The effect of antagonists selective for μ - and δ -opioid receptor subtypes on alcohol consumption in C57BL/6 mice. **Alcohol**, v. 22, p. 85-90, 2000.

KIM, S. G. et al. Effect of the combination of naltrexone and acamprosate on alcohol intake in mice. **Psychiatry Clinical Neuroscience**, v. 58, n. 1, p. 30-36, 2004.

KIEFER, F. et al. Comparing and combining naltrexone and acamprosate in relapse prevention of alcoholism. **Archives General Psychiatry**, v. 60, p. 92-99, 2003.

KOOB, G.; LE MOAL, M. Drug Abuse: hedonic homeostatic dysregulation. **Science**, v. 278, p. 52-58, 1997.

KOOB, G. F. Animal models of craving for ethanol. **Addiction**, v. 95 (Suppl. 2), p. 73-81, 2000.

KOOB, G.; LE MOAL, M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 2, p. 97-129, 2001.

KORNET, M.; GOOSEN, C.; VAN REE, J. M. Effect of naltrexone on alcohol consumption during chronic alcohol drinking and after a period of imposed abstinence in free-choice drinking Rhesus monkeys. **Psychopharmacology**, v. 104, p. 367-376, 1991.

KRANZLER, H. R., MODESTO-LOWE, V.; VAN KIRK, J. Naltrexone vs. Nefazodone for treatment of alcohol dependence. **Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 5, p. 493-503, 2000.

KRYSTAL, J. H. et al. Naltrexone in the treatment of alcohol dependence. **New England Journal of Medicine**, v. 345, p. 1734-1739, 2001.

LÊ, A. D. et al. The effects of selective blockade of delta and mu opiate receptors on ethanol consumption by C57BL/6 mice in a restricted access paradigm. **Brain Research**, v. 630, p. 330-332, 1994.

LÊ, A. D.; SELLERS, E. Interaction between opiate and 5HT₃ receptor antagonists in the regulation of alcohol intake. **Alcohol and Alcoholism**, v. 2, p. 545-549, 1996.

LI, T. K. Pharmacogenetics of responses to alcohol and genes that influence alcohol drinking. **Journal of Studies on Alcohol**, v. 61, p. 5-12, 2000.

LINDHOLM, S. et al. The selective κ -opioid receptor agonist U50,488H attenuates voluntary ethanol intake in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 120, p. 137-146, 2001.

LITTLETON, J.; ZIEGLGANSBERGER, W. Pharmacological mechanisms of naltrexone and acamprosate in the prevention of relapse in alcohol dependence. **Am J Addict.**, v.12 (Suppl 1), p. 3-11, 2003.

MARK, T. L. et al. Physicians' opinions about medications to treat alcoholism. **Addiction**, v. 98, p. 617-626, 2002.

MARK, T. L.; KRANZLER, H. R.; SONG, X. Understanding US addiction physicians' low rate of naltrexone prescription. **Drug Alcohol Dependence**, v. 71, n. 3, p. 219-228, 2003.

MARK, T. L. et al. Barriers to the use of medications to treat alcoholism. **American Journal on Addictions**, v. 12, n. 4, p. 281-294, 2003.

MEISCH, R. A. Oral drug self-administration: an overview of laboratory animal studies. **Alcohol**, v. 24, p. 117-128, 2001.

McFARLAND, K.; ETTEMBERG, A. Reinstatement of drug-seeking behavior produced by heroin-predictive environmental stimuli. **Psychopharmacology**, v. 131, p. 86-92, 1997.

MIDDAUGH, L. D. et al. Naltrexone effects on ethanol reward and discrimination in C57BL/6 mice. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 23, p. 456-464, 1999.

MIDDAUGH, L. D.; LEE, A. M.; BANDY, A. L. Ethanol reinforcement in nondeprived mice: effects of abstinence and naltrexone. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 24, n. 8, p. 1172-1179, 2000.

MIDDAUGH, L. D. et al. Chronic ethanol consumption by C57BL/6 mice promotes tolerance to its interoceptive cues and increases extracellular dopamine, an effect blocked by naltrexone. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 27, n. 12, p. 1892-1900, 2003.

MISRA, A. L. et al. Disposition of [15,16-³H]naltrexone in the central nervous system of the rat. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 4, p. 276-280, 1976.

MONTI, P. M. et al. Building bridges: the transdisciplinary study of craving from the animal laboratory to the lamppost. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 26, n. 2, p. 279-287, 2004.

MYRICK, H.; BRADY, K. T.; MALCOLM, R. New developments in the pharmacotherapy of alcohol dependence. **American Journal on Addictions**, v. 10, p. 3-15, 2001.

O'BRIEN, C. P. et al. Classical conditioning in drug-dependent humans. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 654, p. 400-415, 1992.

OLIVE, M. F. et al. Effects of acute acamprosate and homotaurine on ethanol intake and ethanol-stimulated mesolimbic dopamine release. **European Journal of Pharmacology**, v. 437, p. 55-61, 2002.

O'MALLEY, S. S. et al. Naltrexone and coping skills therapy for alcohol dependence. **Archives General Psychiatry**, v. 49, p. 881-887, 1992.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS. **Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento da CID 10**, Porto Alegre, Artes Médicas, 1993.

PARKES, J. H.; SINCLAIR, J. D. Reduction of alcohol drinking and upregulation of opioid receptors by oral naltrexone in AA rats. **Alcohol**, v. 21, p. 215-221, 2000.

PHILLIPS, T. Animal models for the genetic study of human alcohol phenotypes. **Alcohol Research & Health**, v. 26, n. 3, p. 202-207, 2002.

PHILLIPS, T. J.; WENGER, C. D.; DOROW, J. D. Naltrexone effects on ethanol drinking acquisition and on established ethanol consumption in C57BL/6J mice. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, v. 21, p. 691-702, 1997.

POTGIETER, A. S.; DECKERS, F.; GEERLINGS, P. Craving and relapse measurement in alcoholism. **Alcohol Alcoholism**, v. 34, p. 254-260, 1999.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 3-33, 2003.

REID, L. D.; HUBBELL, C. L. Opioids modulate rats' propensities to take alcoholic beverages. In: **Novel Pharmacological Interventions for Alcoholism**. In: NARANJO, C. A.; SELLERS, E. M. (eds.), p. 121-134, New York, Springer Verlag, 1992.

REID, L. D. Endogenous opioids and alcohol dependence: opioid alkaloids and the propensity to drink alcoholic beverages. **Alcohol**, v. 13, p. 5-11, 1996.

REZVANI, A. et al. Combination pharmacotherapy: a mixture of small doses of naltrexone, fluoxetine, and a thyrotropin-releasing hormone analogue reduces alcohol intake in three strains of alcohol-preferring rats. **Alcohol and Alcoholism**, v. 35, p. 76-83, 2000.

RIBEIRO, A. F. et al. Development of an alcohol addiction model in mice. **Alcohol and Alcoholism** (submitted), 2004.

RICHTER, C. P.; CAMPBELL K. Alcohol taste thresholds and concentration of solution preferred by rats. **Science**, v. 91, p. 507-508, 1940.

ROBERTS, A. J. et al. Excessive ethanol drinking following a history of dependence: animal model of allostasis. **Neuropsychopharmacology**, v. 22, p. 581-594, 2000.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. **Brain Research Reviews**, v. 18, p. 247-291, 1993.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive- sensitization view. **Addiction**, v. 96, p. 103-114, 2001.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 52, p. 297-303, 1995.

SAMSON, H. H.; DOYLE, T. F. Oral ethanol self-administration in the rat: Effect of naloxone. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 22, p. 91-99, 1985.

SAMSON, H. H. et al. Appetitive and consummatory behaviors in the control of ethanol consumption: a measure of ethanol seeking behavior. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, v. 22, p. 1783-1787, 1998.

SEE, R. E. et al. The importance of a compound stimulus in conditioned drug-seeking behavior following one week of extinction from self-administered cocaine in rats. **Drug Alcohol Dependence**, v. 57, p. 41-49, 1999.

SCHWARZ-STEVENSON, K. S.; FILES, F. J.; SAMSON, H. H. Effects of morphine and naloxone on ethanol- and sucrose-reinforced responding in nondeprived rats. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, v. 16, p. 822-832, 1992.

SHIPPENBERG, T. S.; KOOB, G. F. Recent advances in animal models of drug addiction. In: KENNETH, L.; DAVIS et al., (eds) **Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress: an official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 1381-1397, 2002.

SINCLAIR, J. D.; SENTER, R. J. Increased preference for ethanol in rats following alcohol deprivation. **Psychonomic Science**, v. 8, p. 11-12, 1967.

SPANAGEL, R. et al. Anxiety: a potential predictor of vulnerability to the initiation of ethanol self-administration in rats. **Psychopharmacology**, v. 122, p. 369-373, 1995.

SPANAGEL, R.; HÖLTER, S. M. Long-term alcohol self-administration with repeated alcohol deprivation phases: an animal model of alcoholism? **Alcohol & Alcoholism**, v. 34 (Suppl. 2), p. 231-243, 1999.

SPANAGEL, R.; HÖLTER, S. M. Pharmacological validation of a new animal model of alcoholism. **Journal of Neural Transmission**, v. 107, p. 669 –680, 2000.

SPANAGEL, R.; ZIEGLGÄNSBERGER, W. Anti-craving compounds for ethanol: new pharmacological tools to study addictive processes. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 18, p. 54-59, 1997.

SPANAGEL, R. Recent animal models of alcoholism. **Alcohol Research & Health**, v. 24 (Suppl. 2), p. 124-131, 2000.

SPANAGEL, R. Alcohol addiction research: from animal models to clinics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, n. 4, p. 507-518, 2003a.

SPANAGEL, R. The role of the glutamatergic system in alcohol addiction. **Fortschr Neurol Psychiatr**, v. 71 (Suppl 1), p. 33-35, 2003b.

TABAKOFF, B.; HOFFMAN, H. L. Animal models in alcohol research. **Alcohol Research & Health**, v. 24, p. 77-84, 2000.

THOMAS, C. P. et al. Research to practice: adoption of naltrexone in alcoholism treatment. **J Subst Abuse Treat**, v. 24, n. 1, p. 1-11, 2003.

TIFFANY, S. T.; CARTER, B. L. Is craving the source of compulsive drug use? **Journal of Psychopharmacology**, v. 12, p. 23-30, 1998.

UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Alcohol and the brain: neuroscience and neurobehavior. In: **Special report to the US Congress on Alcohol and Health**. 10 ed., United States: National Institutes of Health, p. 78-133, 2000.

VOLPICELLI, J. R. et al. Naltrexone in the treatment of alcohol dependence. **Archives General Psychiatry**, v. 49, p. 876-880, 1992.

VOLPICELLI, J. R. et al. Naltrexone and alcohol dependence: role of subject compliance. **Archives General Psychiatry**, v. 54, p. 737-742, 1997.

WEINSTEIN, A. et al. Integrating the cognitive and physiological aspects of craving. **Journal of Psychopharmacology**, v. 12, p. 31-38, 1998.

WEISS, F. et al. Free-choice responding for ethanol versus water in alcohol preferring (H) and unselected Wistar rats in differentially modified by naloxone, bromocriptine, and methysergide. **Psychopharmacology**, v. 101, p. 178-186, 1990.

WEISS, F. et al. Control of cocaine-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats: effects on recovery of extinguished operant-responding and extracellular dopamine levels in amygdala and nucleus accumbens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 4321-4326, 2000.

WEISS, F.; PORRINO, L. J. Behavioral neurobiology of alcohol addiction: recent advances and challenges. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 9, p. 3332-3337, 2002.

WILLIAMS, K. L.; WOODS, J. H. Oral ethanol-reinforced responding in Rhesus monkeys: Effects of opioid antagonists selective for the μ -, κ - or δ -receptor. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, v. 22, p. 1634-1639, 1999.

WOLFFGRAMM, J. Free choice ethanol intake of laboratory rats under different social conditions. **Psychopharmacology**, v. 101, p. 233-239, 1990.

WOLFFGRAMM, J.; HEYNE, A. From controlled drug intake to loss of control: the irreversible development of drug addiction in the rat. **Review of Behavioural Brain Research**, v. 70, p. 77-94, 1995.

WOLFFGRAMM, J. et al. Animal models of addiction: models for therapeutic strategies? **Journal of Neural Transmission**, v. 107, p. 649-668, 2000.

YAMAMOTO, T.; UNE T. Animal models of psychiatric disorder and their validity – from the perspective of behavioral pharmacology. **Nippon Yakurigaku Zasshi**, v. 120, n. 3, p. 173-180, 2002.

APÊNDICE 1 - AVALIAÇÃO DA AVERSIVIDADE AO SABOR DE QUININA

Para as soluções com concentrações de 0,005 g/l e 0,001g/l de quinina, a ingestão da solução apesar de ter sido menor do que a de água permitiu que o animal continuasse a consumir a solução apesar do sabor aversivo, chegando a apresentar-se significativamente menor a partir do quarto dia de experimento para a solução a 0,005g/l ($t_4 = 9,77$, $p < 0,0001$; $t_5 = 2,15$, $p < 0,05$; $t_6 = 2,17$, $p < 0,05$; $t_7 = 3,20$, $p < 0,01$; teste t independente) e apenas no quarto dia para a solução a 0,001g/l ($t_4 = 4,09$, $p < 0,001$; teste t independente) (tabela 1). Já o consumo da solução com o sabor adulterado com 0,01g/l ou 0,05g/l de quinina foi significativamente inferior ao consumo de água em todos os dias do tratamento ($t_1 = 4,07$, $p < 0,001$; $t_2 = 3,54$, $p < 0,01$; $t_3 = 15,82$; $t_4 = 6,44$; $t_5 = 10,50$; $t_6 = 10,25$; $t_7 = 8,96$, $p < 0,0001$; teste t independente) e ($t_1 = 6,96$; $t_2 = 8,21$; $t_3 = 7,15$; $t_4 = 8,15$; $t_5 = 8,55$; $t_6 = 9,51$; $t_7 = 8,01$, $p < 0,0001$; teste t independente), respectivamente.

A concentração de 0,005g/l de cloridrato de quinina se mostrou aversiva o suficiente para diminuir o consumo das soluções pelos animais sem inibi-lo quase que completamente como foi o observado nas concentrações maiores (0,01g/l e 0,05g/l). Assim, essa concentração foi escolhida para adulterar o sabor das soluções etílicas durante a fase de adulteração do tratamento por livre escolha.

TABELA 01 – CONSUMO DE LÍQUIDO DE ACORDO COM A CONCENTRAÇÃO DE QUININA

Concentração de quinina		0,001 g/L	0,005 g/L	0,01 g/L	0,05 g/L
Número de animais		10	10	10	10
DIA	Escolha do líquido	Consumo de líquido (mL/dia)			
1	Quinina	3,2 ± 0.61	2.8 ± 0.63	1.6 ± 0.43 ***	1.3 ± 0.39 ***
	Água	3.6 ± 0.56	4.4 ± 0.76	4.6 ± 0.60	6.7 ± 0.67
2	Quinina	2.6 ± 0.62	1.8 ± 0.76 *	1.8 ± 0.59 **	0.7 ± 0.30 ***
	Água	3.4 ± 0.54	4.0 ± 0.80	5.2 ± 0.76	6.8 ± 0.68
3	Quinina	2.6 ± 0.62	2.4 ± 0.62 *	0.5 ± 0.22 ***	1.0 ± 0.47 ***
	Água	4.0 ± 0.60	4.6 ± 0.86	5.8 ± 0.25	6.2 ± 0.55
4	Quinina	1,8 ± 0,32 ***	0,5 ± 0,22 ***	1,4 ± 0,37 ***	0,6 ± 0,22 ***
	Água	4,1 ± 0,46	6,0 ± 0,52	5,8 ± 0,57	6,6 ± 0,70
5	Quinina	2,7 ± 0,76	1,9 ± 0,84 *	0,6 ± 0,22 ***	0,6 ± 0,22 ***
	Água	3,4 ± 0,64	4,5 ± 0,87	6,3 ± 0,49	6,5 ± 0,65
6	Quinina	2,9 ± 0,71	2,2 ± 0,69 *	0,9 ± 0,10 ***	0,9 ± 0,18 ***
	Água	3,7 ± 0,65	4,7 ± 0,92	6,3 ± 0,52	6,9 ± 0,60
7	Quinina	2,5 ± 0,85	1,7 ± 0,67 **	1,1 ± 0,10 ***	1,3 ± 0,26 ***
	Água	4,6 ± 0,76	5,2 ± 0,87	6,0 ± 0,54	6,4 ± 0,58

NOTA: Consumo diário de líquido de acordo com a escolha entre água e uma solução de sabor amargo com diferentes concentrações de quinina num período de uma semana. Os dados estão expressos como média ± erro padrão para os diferentes grupos de camundongos para cada concentração de quinina. Os símbolos representam a diferença entre o consumo de quinina e água para cada dia e cada concentração (* p<0,05; ** p<0,005; *** p<0,001, Teste “t” de Student para amostras independentes).

APÊNDICE 2 – ANIMAIS COM PERFIL DE CONSUMO INDEFINIDO

TABELA 1 – PADRÃO INDIVIDUAL DE CONSUMO DE ETANOL DOS ANIMAIS COM PERFIL DE CONSUMO INDEFINIDO E PREFERÊNCIA ENTRE ETANOL E ÁGUA PARA CADA FASE EXPERIMENTAL.

Animal	Livre escolha N [#] =14		Reapresentação N=14		Adulteração N=14		ANOVA de uma via para o consumo de etanol	
	etanol (g/kg/dia)	preferência	etanol (g/kg/dia)	preferência	etanol (g/kg/dia)	preferência	F(2, 40)	p ≤
1	5,1 ± 0,50	A	10,1 ± 0,70 ^a	E	9,1 ± 0,71 ^a	S	18,02	0,0001
6	3,9 ± 0,25	A	11,3 ± 1,35 ^{a,c}	E	7,9 ± 0,53 ^{a,b}	A	25,15	0,0001
7	3,0 ± 0,32	A	8,9 ± 1,19 ^a	S	10,3 ± 1,08 ^a	A	21,35	0,0001
8	3,1 ± 0,19	A	6,8 ± 1,11 ^a	A	7,7 ± 0,93 ^a	A	10,70	0,001
9	2,9 ± 0,37	A	8,2 ± 1,80 ^a	S	7,1 ± 1,14 ^a	A	6,03	0,01
12	10,6 ± 0,21	E	12,3 ± 0,43 ^{a,c}	E	9,1 ± 0,63 ^{a,b}	A	12,77	0,0001
15	9,5 ± 0,56	E	7,5 ± 0,49 ^a	A	7,4 ± 0,25 ^a	A	6,67	0,01
23	6,6 ± 0,41	A	7,7 ± 0,36	E	7,7 ± 0,69	S	1,61	0,30
38	6,5 ± 0,22	E	3,0 ± 0,38 ^a	A	3,1 ± 0,35 ^a	A	39,30	0,0001
42	6,3 ± 0,65	S	4,7 ± 0,45 ^a	A	3,7 ± 0,21 ^a	A	7,64	0,01
52	2,8 ± 0,31	A	12,7 ± 0,67 ^{a,c}	E	10,4 ± 1,06 ^{a,b}	S	51,65	0,0001
54	9,2 ± 0,39	E	7,2 ± 0,43 ^a	S	7,9 ± 0,39 ^a	S	6,34	0,01
60	4,3 ± 0,24	A	9,7 ± 0,74 ^{a,c}	E	12,6 ± 0,57 ^{a,b}	E	60,72	0,0001

NOTA: O consumo de etanol está expresso como média ± erro padrão do consumo diário durante as semanas de cada fase (livre escolha: últimas 2 semanas antes da abstinência; reapresentação: 2 semanas após a abstinência; adulteração: 2 semanas seguintes à reapresentação). A preferência está expressa como Pref.: A – preferência pela água, E – preferência pelo etanol, S – sem preferência. Na coluna da direita estão os valores de F para análise de variância (ANOVA) de uma via para o consumo individual de etanol e os respectivos valores de p. ^a diferente da fase de livre escolha; ^b diferente da fase de reapresentação; ^c diferente da fase de adulteração (p ≤ 0,05 pelo menos, Newman-Keuls). # “N” representa o número de medidas diárias do consumo total de etanol para cada animal.

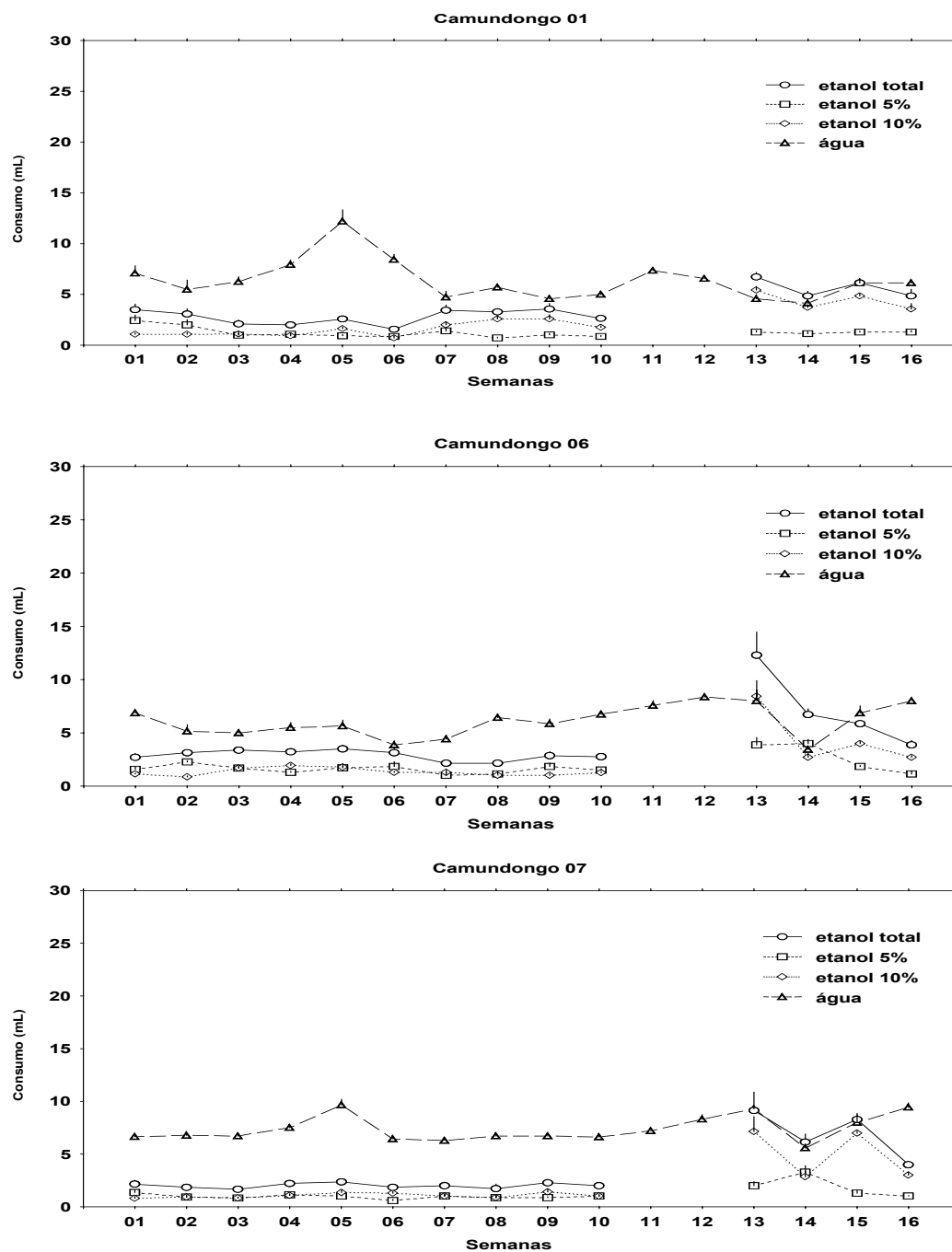


FIGURA 1 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 1, 6 E 7 COM PERFIL DE CONSUMO INDEFINIDO: Consumo de etanol e água ao longo das fases expresso em média \pm erro padrão do consumo diário semanal (mL) (1-10: semanas da fase de livre escolha, 11-12: semanas da fase de abstinência, 13-14: semanas da fase de reapresentação, 15-16: semanas da fase de adulteração).

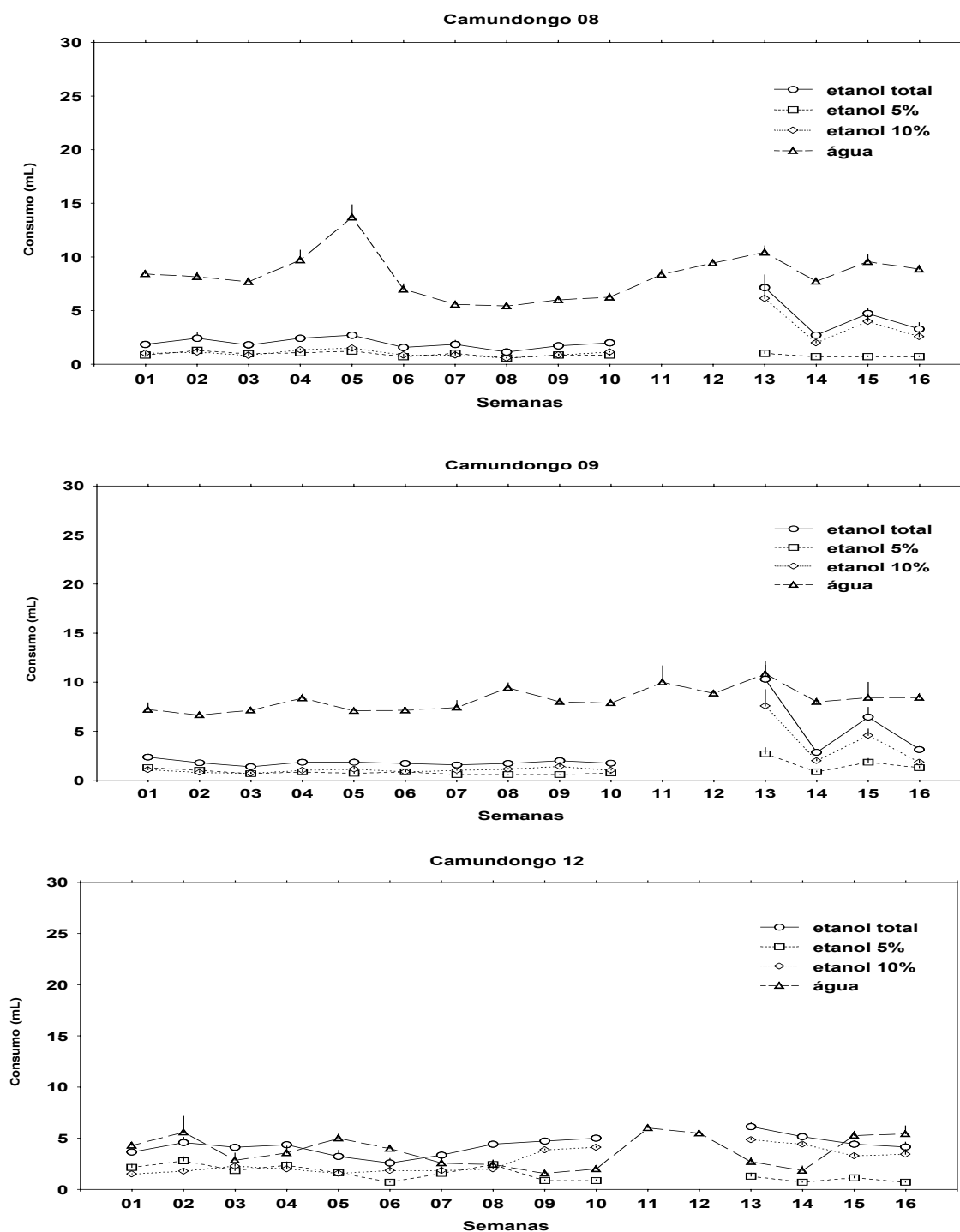


FIGURA 2 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 8, 9 E 12 COM PERFIL DE CONSUMO INDEFINIDO: Consumo de etanol e água ao longo das fases expresso em média \pm erro padrão do consumo diário semanal (mL) (1-10: semanas da fase de livre escolha, 11-12: semanas da fase de abstinência, 13-14: semanas da fase de rerepresentação, 15-16: semanas da fase de adulteração).

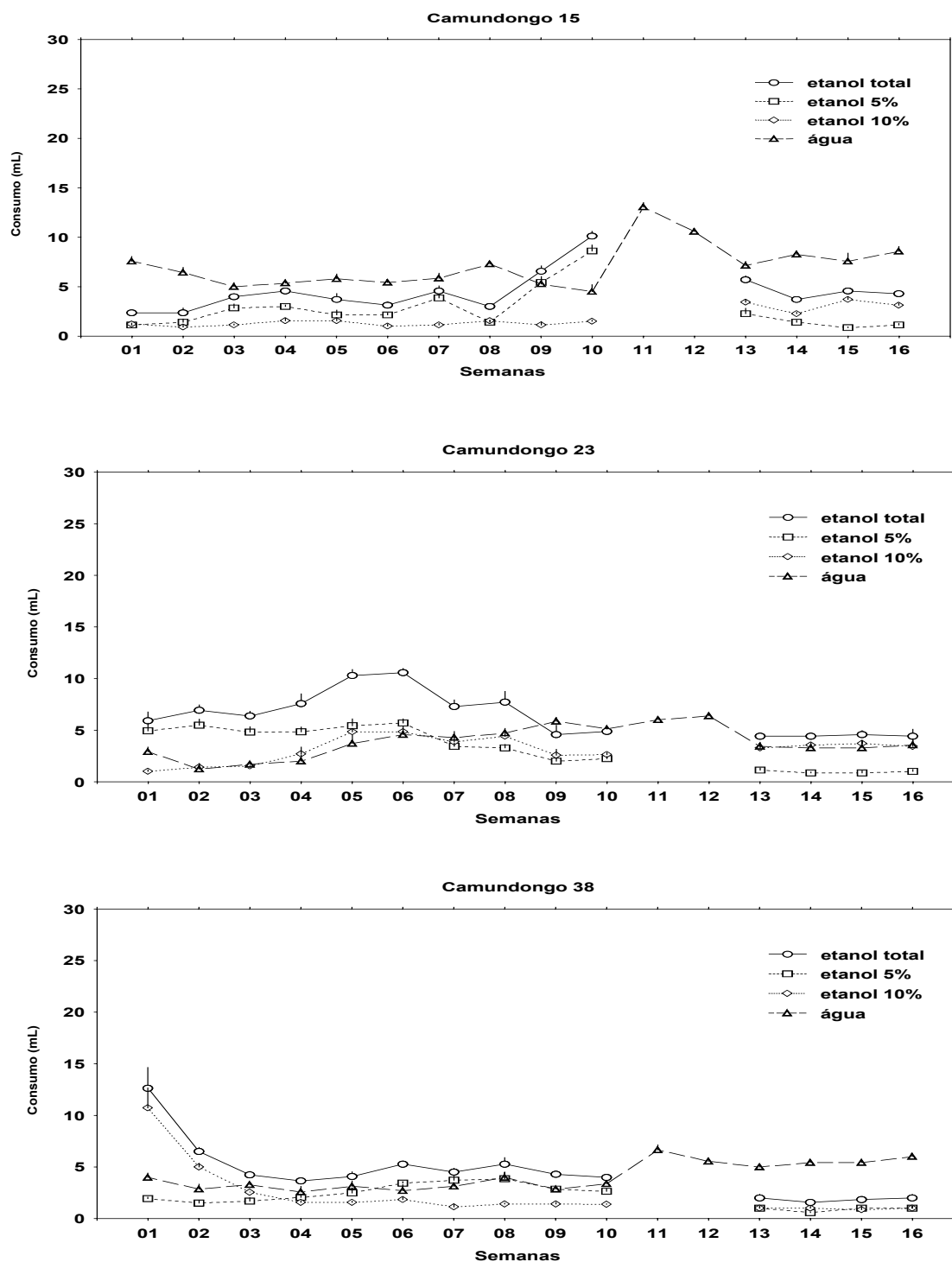


FIGURA 3 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 15, 23 E 38 COM PERFIL DE CONSUMO INDEFINIDO: Consumo de etanol e água ao longo das fases expresso em média \pm erro padrão do consumo diário semanal (mL) (1-10: semanas da fase de livre escolha, 11-12: semanas da fase de abstinência, 13-14: semanas da fase de reapresentação, 15-16: semanas da fase de adulteração).

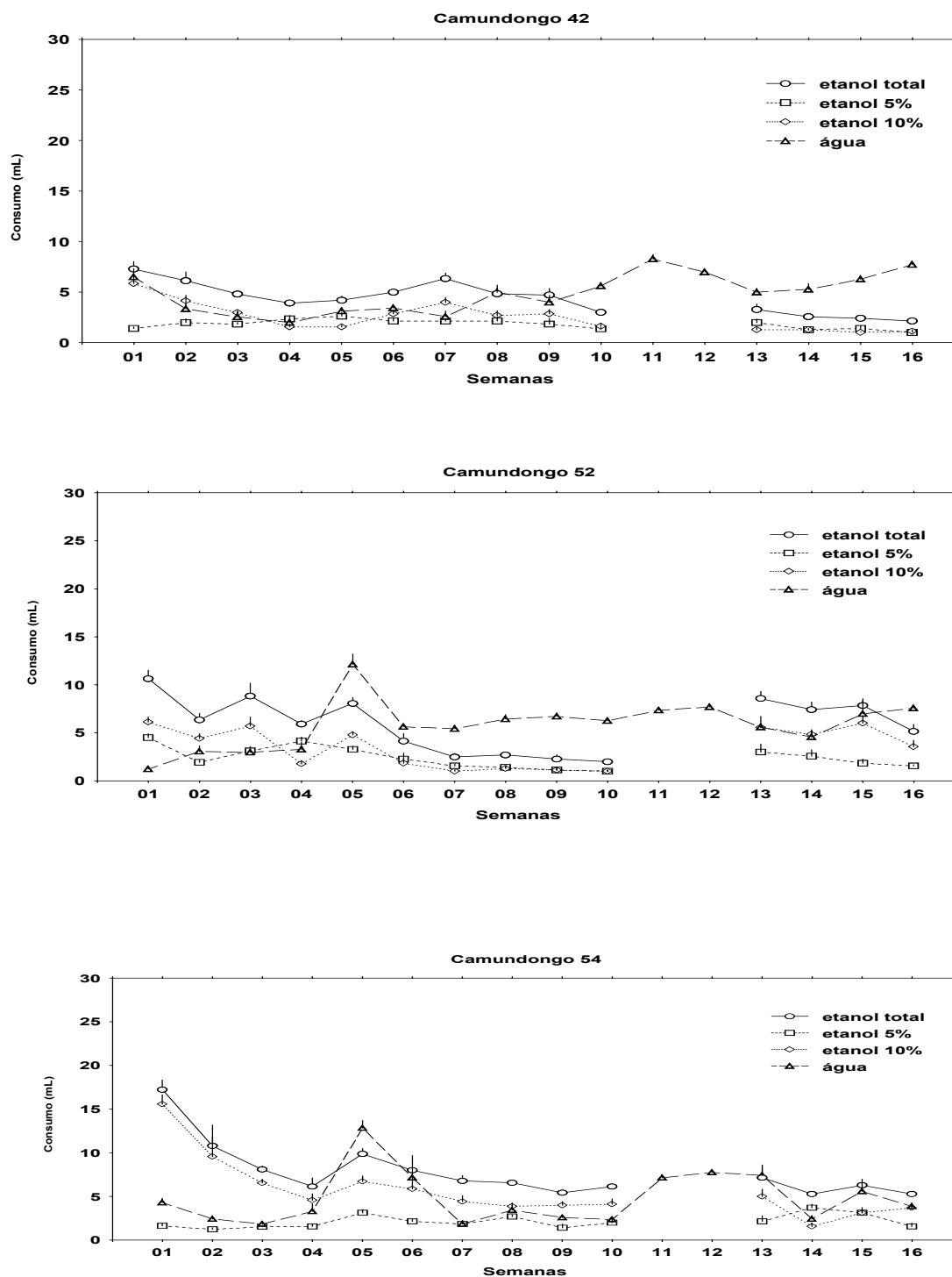


FIGURA 4 – CONSUMO PARA OS ANIMAIS 42, 52 E 54 COM PERFIL DE CONSUMO INDEFINIDO: Consumo de etanol e água ao longo das fases expresso em média \pm erro padrão do consumo diário semanal (mL) (1-10: semanas da fase de livre escolha, 11-12: semanas da fase de abstinência, 13-14: semanas da fase de reapresentação, 15-16: semanas da fase de adulteração).

APÊNDICE 3 – ANÁLISES COMPORTAMENTAIS

TABELA 01 – COMPARAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS PARAMÉTRICAS COMPORTAMENTAIS MEDIDAS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (continua)

VARIÁVEL	Grupos	Basal ^v	F ₁ (3,51)	Abstinência ^v	t	F ₂ (3,51)
LCE-EA	D	11 ± 1,0	2,10 p= 0,11	6 [#] ± 1,0	4,46 p= 0,001	0,68 p= 0,57
	P	12 ± 1,0		8 [#] ± 0,8	3,93 p= 0,001	
	L	10 ± 0,8		7 [#] ± 0,9	4,39 p= 0,001	
	C	9 ± 0,8		7 ± 1,5	2,07 p= 0,07	
LCE-TA	D	104 ± 6,3	0,07 p= 0,97	59 [#] ± 9,9	4,47 p= 0,001	0,44 p= 0,72
	P	104 ± 5,9		72 [#] ± 8,86	2,90 p= 0,01	
	L	104 ± 4,3		70 [#] ± 8,9	4,08 p= 0,001	
	C	101 ± 5,4		74 [#] ± 12,5	2,93 p= 0,02	
LCE-EF	D	5 ± 0,7	1,75 p= 0,17	5 ± 0,7	0,07 p= 0,94	1,78 p= 0,16
	P	7 ± 1,3		7 ± 0,6	0,04 p= 0,97	
	L	5 ± 0,4		6 ± 0,6	-2,05 p= 0,06	
	C	6 ± 0,7		5 ± 0,9	1,19 p= 0,27	
LCE-TF	D	53 ± 5,9	0,08 p= 0,97	86 [#] ± 8,7	-3,75 p= 0,01	0,22 p= 0,88
	P	51 ± 6,1		76 [#] ± 8,7	-2,50 p= 0,03	
	L	53 ± 4,2		79 [#] ± 7,8	-3,83 p= 0,01	
	C	55 ± 4,9		79 [#] ± 12,3	-2,70 p= 0,02	
LCE-TL	D	2 ± 0,4	0,45 p= 0,72	9 ± 4,4	-1,59 p= 0,13	1,18 p= 0,33
	P	3 ± 1,0		4 ± 1,8	-0,24 p= 0,81	
	L	3 ± 0,8		3 ± 1,7	-0,20 p= 0,85	
	C	4 ± 1,3		4 ± 1,3	-0,15 p= 0,89	
LCE-TM	D	21 ± 1,4	0,14 p= 0,93	26 [#] ± 1,8	-2,44 p= 0,03	0,93 p= 0,43
	P	22 ± 1,8		28 [#] ± 2,0	-2,19 p= 0,05	
	L	21 ± 1,6		29 ± 2,8	-2,07 p= 0,06	
	C	21 ± 2,1		24 ± 2,1	-0,81 p= 0,44	

NOTA: ^vmédia ± ep das variáveis comportamentais medidas durante o teste basal (Basal) e período de abstinência (Abstinência): (LCE: labirinto em cruz elevado; EL: número de elevações; TL: tempo de latência; EA: número de entrada no braço aberto; TA: tempo de permanência no braço aberto; EF: número de entrada no braço fechado; TF: tempo de permanência no braço fechado; TM: tempo no meio; f: braço fechado). t: comparação entre o teste basal e abstinência; F₁: comparação entre os grupos durante o teste basal; F₂: comparação entre os grupos durante o período de abstinência. [#]diferença no mesmo grupo (p<0,05, teste t dependente); *diferença entre os grupos (p<0,05, ANOVA, Newmann-Keuls)

TABELA 01 – COMPARAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS PARAMÉTRICAS COMPORTAMENTAIS MEDIDAS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

VARIÁVEL	Grupos	Basal ^V	F ₁ (3,51)	Abstinência ^V	t	F ₂ (3,51)
LCE- EL _f	D	-	-	8 ± 1,0	-	0,81 p= 0,49
	P	-		6 ± 1,2	-	
	L	-		8 ± 1,4	-	
	C	-		7 ± 1,5	-	

NOTA: ^Vmédia ± ep das variáveis comportamentais medidas durante o teste basal (Basal) e período de abstinência (Abstinência): (LCE: labirinto em cruz elevado; EL: número de elevações; TL: tempo de latência; EA: número de entrada no braço aberto; TA: tempo de permanência no braço aberto; EF: número de entrada no braço fechado; TF: tempo de permanência no braço fechado; TM: tempo no meio; f: braço fechado). t: comparação entre o teste basal e abstinência; F₁: comparação entre os grupos durante o teste basal; F₂: comparação entre os grupos durante o período de abstinência. #diferença no mesmo grupo (p<0,05, teste t dependente); *diferença entre os grupos (p<0,05, ANOVA, Newmann-Keuls)

TABELA 02 – COMPARAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS NÃO PARAMÉTRICAS COMPORTAMENTAIS MEDIDAS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Variável	Grupos	Basal ^N	H ₁ (3,55)	Abstinência ^N	Z	H ₂ (3,55)
LCE- ES	D	-	-	2,0 (0,0 – 6,0)	-	1,08 p= 0,78
	P	-		1,5 (0,0 – 3,0)	-	
	L	-		1,0 (0,0 – 3,5)	-	
	C	-		2,0 (0,0 – 3,0)	-	
LCE- PE _a	D	-	-	1,0 (0,0 – 2,0)	-	1,13 p= 0,77
	P	-		1,0 (0,0 – 2,0)	-	
	L	-		0,5 (0,0 – 1,5)	-	
	C	-		1,0 (0,0 – 1,0)	-	
LCE- AL _f	D	-	-	2,0 (0,0 – 4,0)	-	6,18 p= 0,10
	P	-		0,0 (0,0 – 1,0)	-	
	L	-		0,0 (0,0 – 1,0)	-	
	C	-		0,5 (0,0 – 2,0)	-	
LCE- PE _f	D	-	-	0,0 (0,0 – 0,0)	-	3,51 p= 0,32
	P	-		0,0 (0,0 – 0,0)	-	
	L	-		0,0 (0,0 – 0,0)	-	
	C	-		0,0 (0,0 – 0,0)	-	

NOTA: ^Nmediana (quartil inferior – quartil superior) das variáveis comportamentais medidas durante o teste basal (Basal) e período de abstinência (Abstinência); (LCE: labirinto em cruz elevado; EL: número de elevações; AL: tempo de autolimpeza; ES: número de espreitas; a: braço aberto; f: braço fechado; PE: posição esticada). Z: comparação entre o teste basal e abstinência; H₁: comparação entre os grupos durante o teste basal; H₂: comparação entre os grupos durante o período de abstinência; #diferença no mesmo grupo (p<0,05, teste Wilcoxon); *diferença entre os grupos (p<0,05, teste de Kruskal-Wallis)

TABELA 03 – COMPARAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS PARAMÉTRICAS COMPORTAMENTAIS MEDIDAS NO CAMPO ABERTO

Variável	Grupos	Basal ^V	F ₁ (3,51)	Abstinência ^V	t	F ₂ (3,51)
CA-AMB	D	85 ± 6,1	0,55 p= 0,65	58 [#] ± 7,4	2,76 p= 0,02	2,55 p= 0,07
	P	84 ± 3,3		58 [#] ± 5,1	4,99 p= 0,001	
	L	80 ± 3,9		72 ± 4,2	1,41 p= 0,18	
	C	77 ± 6,7		79 ± 9,2	-0,26 p= 0,80	
CA-EL	D	26 ± 3,1	0,47 p= 0,71	7 [#] ± 1,4	5,98 p= 0,0001	0,99 p= 0,41
	P	27 ± 2,9		7 [#] ± 2,2	5,75 p= 0,0001	
	L	28 ± 2,9		11 [#] ± 2,2	5,90 p= 0,0001	
	C	23 ± 1,7		7 [#] ± 2,3	6,10 p= 0,0002	
CA-TPT	D	-	-	-	-	-
	P	-		-	-	
	L	-		-	-	
	C	-		-	-	

NOTA: ^Vmédia ± ep das variáveis comportamentais medidas durante o teste basal (Basal) e período de abstinência (Abstinência): (CA: campo aberto; AMB: número de ambulações; EL: número de elevações; TPT: tempo parado total). t: comparação entre o teste basal e abstinência; F₁: comparação entre os grupos durante o teste basal; F₂: comparação entre os grupos durante o período de abstinência; [#]diferença no mesmo grupo (p<0,05, teste t dependente); *diferença entre os grupos (p<0,05, ANOVA, Newman-Keuls)

TABELA 04 – COMPARAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS NÃO PARAMÉTRICAS COMPORTAMENTAIS MEDIDAS NO CAMPO ABERTO

Variável	Grupos	Basal ^N	H ₁ (3,55)	Abstinência ^N		H ₂ (3,55)
CA-AL	D	0,0 (0,0 – 0,0)	1,74 p= 0,63	0,0 (0,0 – 0,0)	1,07 p= 0,29	3,87 p= 0,28
	P	0,0 (0,0 – 5,0)		0,0 (0,0 – 0,0)	1,83 p= 0,07	
	L	0,0 (0,0 – 0,0)		0,0 (0,0 – 0,0)	1,60 p= 0,11	
	C	0,0 (0,0 – 0,0)		0,0 (0,0 – 0,0)	-	
CA-TL	D	3,0 (2,0 – 8,0)	4,26 p= 0,24	12,0 [#] (5,0 – 15,0)	2,10 p= 0,04	7,43 p= 0,06
	P	8,5 (3,0 – 12,0)		20,5 [#] (11,0 – 35,0)	2,73 p= 0,01	
	L	4,0 (2,5 – 5,0)		9,5 [#] (6,5 – 15,5)	2,71 p= 0,01	
	C	7,5 (3,0 – 9,0)		9,0 [#] (4,0 – 20,0)	2,04 p= 0,04	
CA- PE _c	D	-	-	1,0 (0,0 – 4,0)	-	9,61 p= 0,02
	P	-		4,5* (2,0 – 6,0)	-	
	L	-		2,5 (0,5 – 4,0)	-	
	C	-		0,0 (0,0 – 4,0)	-	
CA- PE _p	D	-	-	1,0 (0,0 – 3,0)	-	8,66 p= 0,03
	P	-		2,0 (0,0 – 4,0)	-	
	L	-		0,0 (0,0 – 3,5)	-	
	C	-		5,0* (3,0 – 5,0)	-	

NOTA: ^Nmediana (quartil inferior – quartil superior) das variáveis comportamentais medidas durante o teste basal (Basal) e período de abstinência (Abstinência): (CA: campo aberto; AL: tempo de autolimpeza; TL: tempo de latência; ES: número de espreitas; PE: posição esticada; c: centro; p: periferia). Z: comparação entre o teste basal e abstinência; H₁: comparação entre os grupos durante o teste basal; H₂: comparação entre os grupos durante o período de abstinência; [#]diferença no mesmo grupo (p<0,05, teste Wilcoxon); *diferença entre os grupos (p<0,05, teste Kruskal-Wallis)

TABELA 05 – COMPARAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS PARAMÉTRICAS COMPORTAMENTAIS MEDIDAS NA CAIXA DE MOVIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA

Variável	Grupos	Basal ^V	F ₁ (3,51)	Abstinência ^V	t	F ₂ (3,51)
CME-AMB	D	37 ± 2,7	0,28 p= 0,84	28 [#] ± 2,4	2,65 p= 0,02	2,75 p= 0,05
	P	38 ± 3,1		35 ± 3,1	0,65 p= 0,53	
	L	35 ± 2,4		38 ± 1,8	-1,03 p= 0,32	
	C	35 ± 2,5		37 ± 3,5	-0,43 p= 0,68	
CME-EL	D	15 ± 2,0	0,79 p= 0,50	10 [#] ± 0,9	2,83 p= 0,01	0,83 p= 0,48
	P	12 ± 2,0		11 ± 1,7	0,71 p= 0,36	
	L	15 ± 1,8		13 ± 1,3	1,31 p= 0,21	
	C	12 ± 2,0		11 ± 1,3	0,77 p= 0,46	
CME-TPT	D	-	-	-	-	-
	P	-		-	-	
	L	-		-	-	
	C	-		-	-	

NOTA: ^Vmédia ± ep das variáveis comportamentais medidas durante o teste basal (Basal) e período de abstinência (Abstinência): (CME: caixa de movimentação espontânea; AMB: número de ambulações; EL: número de elevações; TPT: tempo parado total). t: comparação entre o teste basal e abstinência; F₁: comparação entre os grupos durante o teste basal; F₂: comparação entre os grupos durante o período de abstinência. [#]diferença no mesmo grupo (p<0,05, teste t dependente); *diferença entre os grupos (p<0,05, ANOVA, Newman-Keuls)

TABELA 06 – COMPARAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS NÃO PARAMÉTRICAS COMPORTAMENTAIS MEDIDAS NA CAIXA DE MOVIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA

Variável	Grupos	Basal ^N	H ₁ (3,55)	Abstinência ^N		H ₂ (3,55)
CME-AL	D	5,0 (0,0 – 6,0)	0,47 p= 0,93	5,0 (4,0 – 10,0)	1,02 p= 0,31	4,91 p= 0,18
	P	4,0 (3,0 – 8,0)		6,0 (4,0 – 11,0)	0,84 p= 0,40	
	L	4,0 (3,5 – 6,5)		3,0 (3,0 – 6,0)	0,68 p= 0,50	
	C	4,0 (2,0 – 6,0)		6,0 (4,0 – 7,0)	1,40 p= 0,16	

NOTA: ^Nmediana (quartil inferior – quartil superior) das variáveis comportamentais medidas durante o teste basal (Basal) e período de abstinência (Abstinência); (CME: caixa de movimentação espontânea; AL: tempo de autolimpeza). Z: comparação entre o teste basal e abstinência; H₁: comparação entre os grupos durante o teste basal; H₂: comparação entre os grupos durante o período de abstinência; #diferença no mesmo grupo (p<0,05, teste de Wilcoxon); *diferença entre os grupos (p<0,05, teste de Kruskal-Wallis)

APÊNDICE 4 – ANÁLISE DOS PESOS POR GRUPO

Em relação ao peso dos animais, observou-se interação entre os fatores tratamento e grupo ($F(45,765) = 2,90$, $p < 0,0001$). Levando em consideração a média de peso dos animais durante todo o experimento, o grupo D apresentou peso significativamente menor do que os grupos L e controle ($F(3,51) = 6,00$, $p < 0,01$) (figura 1). No mesmo grupo foi relatado um aumento significativo do peso ao longo do experimento ($F_D(15,210) = 30,27$, $F_P(15,195) = 62,04$, $F_L(15,225) = 77,76$, $F_C(15,135) = 33,17$, $p < 0,0001$).

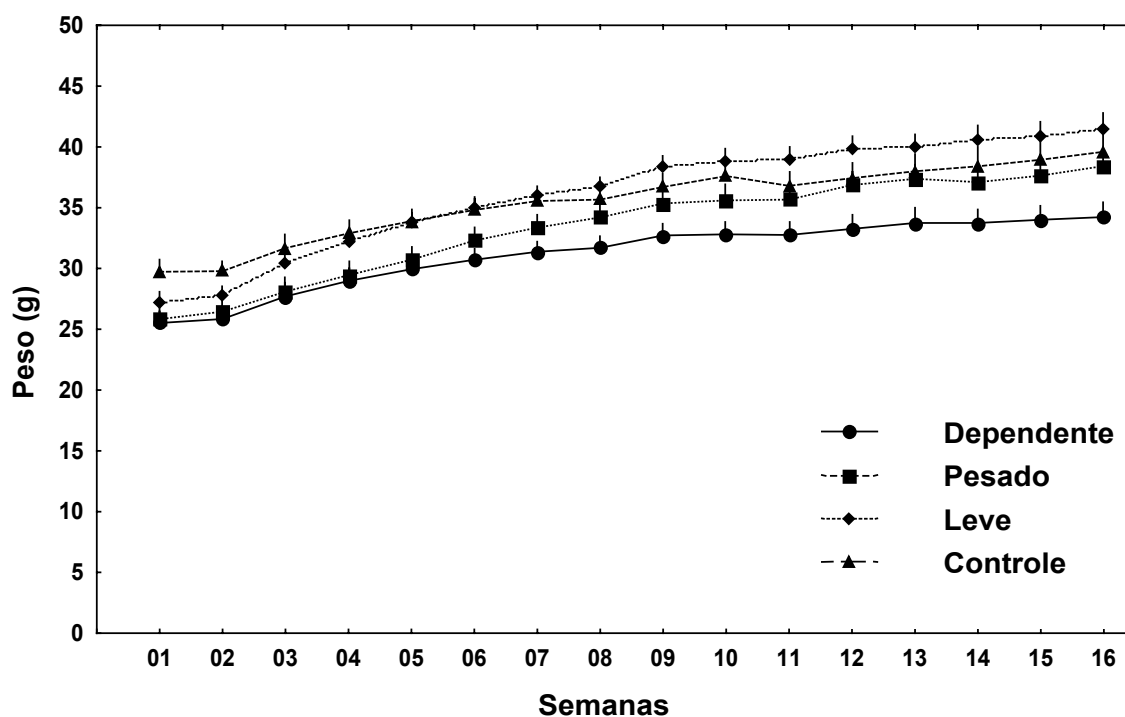


FIGURA 1 - PESO POR GRUPO: média \pm erro padrão dos pesos corporais para cada semana de tratamento.